

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv způsobu porodu na zdraví a mikrobiotu dětí
Diplomová práce**

Autor práce: Bc. Andrea Mařhová

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

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

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv způsobu porodu na zdraví a mikrobiotu dětí" 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 datum odevzdání

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Šárce Musilové, Ph.D za pomoc s tvorbou diplomové práce, za poskytnutí svých vědomostí a času, které mi věnovala. Děkuji i katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky za poskytnutí prostorů a materiálu pro tuto diplomovou práci.

Vliv způsobu porodu na zdraví a mikrobiotu dětí

Souhrn

Mikrobiota je souhrn až tisíců druhů bakterií. Ve většině případů se jedná o prospěšné bakterie, nezbytné pro správný vývoj našeho zdraví. Všeobecně se mezi prospěšné bakterie zařazují laktobacily a bifidobakterie, naopak některé druhy z rodu *Enterococcus* a *Clostridium* jsou považovány za patogenní bakterie. Kolonizace střeva novorozence je velmi dynamický proces. Vývoj mikrobioty je u každého jedince individuální a je ovlivněn řadou faktorů. Za hlavní faktor ovlivňující složení mikrobioty je považován způsob porodu. Mnoho studií již prokázalo negativní vliv císařského porodu na složení mikrobioty, vedoucí k vyššímu výskytu metabolických onemocnění, civilizačních onemocnění, ekzému, astmatu atd. Dalšími důležitými faktory ovlivňující mikrobiotu novorozence jsou způsob výživy, podávání antibiotik, míra urbanizace, gestační věk a podávání suplementů. Nejvíce využívanými suplementy jsou probiotika. Probiotika definujeme jako živé prospěšné mikroorganismy, které pozitivně ovlivňují náš zdravotní stav, primárně pak podporují funkci střevní mikrobioty a napomáhají udržovat její eubiózu.

Cílem této diplomové práce bylo popsat změny v diverzitě střevní mikrobioty dvojčat narozených císařským řezem. Především pak zkoumat modulaci mikrobioty při podávání probiotických preparátů. Laboratorní část práce byla založena na mikrobiologické, kultivační analýze s následnou identifikací vzorků pomocí zařízení MALDI-TOF.

Vzorky stolice dvojčat narozených císařským řezem byly odebírány po dobu 7 let. Celkem bylo od obou dětí odebráno 26 vzorků. Sledovány byly změny způsobené podáváním probiotického preparátu Biopron a změny způsobené výživou, v tomto případě dětské kaše od značky Beba a Nutrilon. Monitorovány byly celkové počty anaerobních bakterií, laktobacili, bifidobakterie, *E. coli*, koliformní bakterie a enterokoky.

Klíčová slova: mikrobiota, bifidobakterie, laktobacily, císařský porod, probiotika

Influence of mode of delivery on health and infant's microbiota

Summary

Microbiota is complex of thousands of species of bacteria. There are mostly beneficial bacteria, which are necessary for development of our health. Beneficial bacteria are mainly lactobacillus and bifidobacteria, bacteria like clostridia and enterococcus are known as potential pathogenic bacteria. Colonization of infant's gut is very dynamic process. The development of gut microbiota is individual for each person and it is affected by many factors. The main factor, which affected composition of gut microbiota is mode of delivery. The negative effect of cesarean section on infant's gut microbiota was approved by many studies, it led also to higher incidence of metabolic illnesses, lifestyle diseases, eczema, asthma etc. Another important factor is nutrition, antibiotics intake, level of urbanization, gestational age and administration of supplements. The most common supplements are probiotics. Probiotics are defined as live beneficial microorganisms, which have a positive impact on our health. It supports function of gut microbiota primary, and it helps to keep eubiosis balanced.

The aim of this thesis was to describe changes in gut microbiota of twins borned by cesarean section. The main goal was to analyze microbiota modulation during probiotics intake. The laboratory part of this theses was based on microbiological cultivation analysis and on identification of samples by MALDI-TOF.

The samples of twins borned by cesarean section was collected for 7 years. The total number of collected samples was 26. The changes caused by intake of probiotic Biopron was monitored the most, changes caused by nutrition, in this case mash from company Beba and Nutrilon was monitored also. The monitored bacteria were total count of anaerobic bacteria, lactobacilli, bifidobacteria, *E. coli*, coliform bacteria, and enterococci.

Keywords: microbiota, bifidobacteria, lactobacillus, caesarean section, probiotics

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Střevní mikrobiota	10
3.1.1	Složení střevní mikrobioty	10
3.1.2	Střevní mikrobiota a imunita	11
3.2	Vývoj mikrobioty	11
3.2.1	Střevní mikrobiota in utero	11
3.2.2	Kolonizace trávicího traktu během porodu	12
3.2.3	Střevní mikrobiota mekonium	12
3.2.4	Postnatální vývoj mikrobioty	13
3.3	Faktory ovlivňující vývoj střevní mikrobioty	13
3.3.1	Vliv způsobu porodu na mikrobiotu	13
3.3.1.1	Porod císařským řezem	14
3.3.1.2	Vaginální porod	15
3.3.2	Vliv výživy na mikrobiotu	17
3.3.2.1	Výživa matěřským mlékem	17
3.3.2.2	Umělá výživa	18
3.3.2.3	Podávání příkrmů	19
3.3.3	Vliv podávání antibiotik	20
3.3.4	Vliv gestačního věku	20
3.3.5	Vliv urbanizace	21
3.3.6	Vliv podávání suplementů	22
3.3.6.1	Probiotika	22
3.3.6.1.1	Podávání probiotik dětem narozených císařskou sekcí	24
3.3.6.2	Prebiotika	25
3.3.6.3	Synbiotika	26
3.3.6.4	Postbiotika	27
4	Materiál a metodika	29
4.1	Kojenci	29
4.2	Odebrání a příprava vzorků	29
4.3	Příprava médií a kultivace	29
4.4	Vyhodnocení rozboru	30
4.5	Izolace kolonií	31
4.6	Výběr vzorků a analýza MALDI-TOF	31

5	Výsledky.....	32
5.1	Rozbor střevní mikrobioty	32
5.2	Vývoj mikrobioty kojenců v čase.....	33
5.3	Porovnání počtů bakterií po zařazení probiotik	35
5.4	Porovnání vývoje mikrobioty mezi kojenci	36
6	Diskuze.....	40
6.1	Střevní mikrobiota po císařském porodu	40
6.1.1	Modifikace střevní mikrobioty podáváním probiotik.....	40
6.1.2	Vliv užívání probiotik na jednotlivce	41
7	Závěr	43
8	Literatura.....	44
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	49
10	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Naše tělo je osídleno vysokým počtem organismů. Společenství těchto mikroorganismů je nazýváno mikrobiota. V posledních letech se stala předmětem mnoha studií, neboť v ní vědci vidí značný potenciál a šanci najít odpověď na řadu otázek souvisejících s lidským zdravím.

Formování střevní mikrobioty začíná již od narození. Mikrobiota novorozence je velmi dynamická a její složení je v této fázi vývoje závislé především na způsobu porodu. V případě vaginálního porodu přichází novorozenec do styku s bakteriemi z kůže matky, s jejími fekálními bakteriemi a vaginální mikrobiotou. U císařského porodu dochází pouze ke styku s bakteriemi vyskytující se na kůži zdravotnického personálu a mikroorganismy z okolí a mikrobiota novorozence, pak není osídlena mikroorganismy, které jsou považovány za prospěšné jako jsou laktobacily a bifidobakterie, místo toho je kolonizována klostridii, enterokoky či *E. coli*. Složení střevní mikrobioty kojence však lze upravit podáváním probiotik, prebiotik nebo synbiotik. Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy vytvářející substrát pro živé mikroorganismy v našem střevě, které nazýváme probiotiky. Kombinací prebiotik s probiotiky jsou synbiotika.

Složení mikrobioty v prvních měsících života je zásadní pro správný vývoj jedince a následně ovlivňuje jeho zdravotní stav do budoucna, protože pomáhá v boji proti patogením mikroorganismům, zlepšuje imunitní systém jedince a předchází radě onemocnění jako je ekzém, asthma, obezita či jiné nemoci spojené s rozvratem střevní mikrobioty. Nutno dodat, že složení mikrobioty každého jedince je ojedinělé, a proto neexistuje jednotný postup, jak lze střevní mikrobiotu modulovat ve prospěch našeho zdraví.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této práce je prokázat účinnost podávání probiotických preparátů či změny diety u dětí narozených císařským řezem a celkově zpracovat problematiku vývoje střevní mikrobioty. Sledovalo se snížení počtu patogeních bakterií jako jsou klostridie a entrokoky a taky vliv na počty ostatních bakterií kolonizující střevní prostředí.

Hypotézou je předpoklad, že podávání probiotických preparátů může pozitivně modulovat střevní mikrobiotu.

3 Literární rešerše

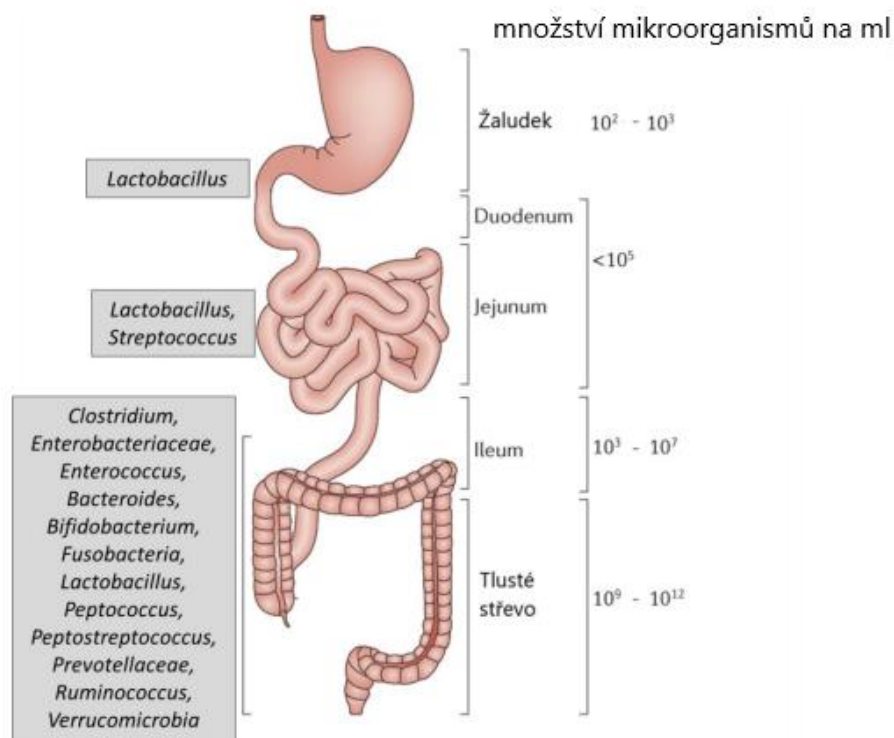
3.1 Střevní mikrobiota

Lidské tělo je osídleno velkým množstvím mikroorganismů, nejedná se pouze o bakterie ale i o *Funghi*, *Archaea*, *Protozoa* a viry. Tento komplex nazýváme mikrobiota a v posledních letech se mu dostává čím dál tím větší pozornosti. Pojem střevní mikrobiota je ekvivalentem pro dříve používaný pojem střevní mikroflóra. Vzhledem k tomu, že slovo flóra je charakteristické pro rostlinstvo a jeho používání bylo tedy zavádějící, byl zaveden název mikrobiota (Belizário, 2015).

V našem gastrointestinálním traktu najdeme asi 50 bakteriálních kmenů a více než 500 druhů bakterií o celkovém počtu 10^{13} - 10^{14} mikroorganismů, kteří obsahují až 150x víc genů než náš vlastní genom. Většina těchto mikroorganismů kolonizuje poslední část tenkého střeva, ileum a tlusté střevo. Jejich váha se odhaduje až na 1,5 kg (Williams, 2010). Mikroorganismy přispívají ke zdraví jedince pomocí biosyntézy vitamínů a esenciálních aminokyselin a štěpením nestravitelných složek potravy na vedlejší metabolické produkty jako je butyrát, acetát či propionát (Topping, 2001).

3.1.1 Složení střevní mikrobioty

Trávicí trakt člověka je v různých částech osídlen rozličnými druhy a počty mikroorganismů (MO). Denzita MO narůstá od žaludku, kde je nižší pH, směrem k tlustému střevu. V duodenu se počet bakteriálních buněk odhaduje na 10^3 /ml, v jejunu je až desetinásobný počet bakterií a v ileu se počty uvádějí až v desítkách milionů viz. Obr. č. 1 (Mowat et al., 2014, upraveno).



Obr. č. 1 (Mowat et al., 2014, upraveno)

Velkou část střevních bakterií není možné kultivovat, protože nejsou dostupné kultivační techniky, které jsou pro daný druh bakterií vhodné, a proto se k jejich identifikaci využívají molekulárně genetické metody založené na sekvenování části bakteriální ribozomální RNA.

Dominantní skupinu tvoří striktně anaerobní bakterie, nalezneme zde ale i fakultativně anaerobní nebo aerobní bakterie. Počet druhů mikroorganismů osidlujících náš trakt je individuální, hodnoty se většinou pohybují od 15 do 36 000. Hlavními zástupci ve zdravém střevním prostředí jsou grampozitivní bakterie kmene Firmicutes a gramnegativní bakterie *Bacteroidetes*. Většina zástupců kmene Firmicutes patří do třídy *Clostridia* a jenom malé množství zástupců zařazujeme do kmene *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* a *Verrucomicrobia* (Frank, 2008).

3.1.2 Střevní mikrobiota a imunita

Střevní mikrobiota hraje důležitou roli v ochraně proti patogenům, vývoji imunitního systému, syntéze esenciálních aminokyselin, vitamínů a enzymů. Závislost imunity na střevní mikrobiotě a obráceně se nedá popřít. Imunitní systém rozlišuje patogenní a komenzální bakterie pomocí tzv. toll like receptorů (TLRs), které se nachází v epitelálních a lymfoidních buňkách tenkého střeva. TLRs způsobují imunologickou toleranci ke komenzálním bakteriím, potlačením zánětlivé odpovědi. Pokud by k potlačení reakce nedošlo, spustila by se kaskáda reakcí aktivujících geny pro cytokiny, proteiny akutní fáze atd. (Lazar et al., 2018).

Mimo to se střevní mikrobiota podílí i na funkci neutrálních buněk, diferenciaci T buněk na Th1, Th2, Th17 a regulační T buňky (regulují odpověď imunitního systému). Buňky Th17 vylučují důležité cytokiny, které se podílí na udržení imunitní homeostázy a vzniku zánětů (Lazar et al., 2018). Dle (Mazmanian et al., 2008) dojde při podání purifikovaného kapsulárního polysacharidu komenzální bakterie *Bacteroides fragilis* k potlačení zánětlivé odpovědi a zároveň ke stimulaci tvorby lymfocytů TCD4 a protizánětlivého IL-10.

Komenzální bakterie jsou rovněž důležité pro tvorbu IgA. Jedná se o sekreční protilátky nejhodněji zastoupené v našem gastrointestinálním traktu, které nás chrání proti působení toxinů tím, že inhibují vazbu těchto toxinů na hostitelský epitel a jejich následné pronikání do *lamina propria*. Tento mechanismus byl popsán i ve studii (Fagarasan et al., 2010), kdy byl u bezmikrobních myší prokázán snížený počet buněk produkujících IgA. IgA buňky jsou tedy důležité zejména pro podporu funkce střevní bariéry a udržování mutualismu mezi hostitelem a komenzály.

3.2 Vývoj mikrobioty

Naše mikrobiota je velmi variabilní systém, který se vyvíjí od narození až do konce našeho života. Na jeho formování má vliv hned několik faktorů. Nejvýznamnější roli ve vývoji mikrobioty hraje způsob porodu, dalšími faktory jsou pak výživa v prvních měsících života, podávání antibiotik, gestační věk novorozence, urbanizace a v neposlední řadě i podávání suplementů (Zhuang et al., 2019).

3.2.1 Střevní mikrobiota in utero

Vývoj mikrobioty in utero je velmi kontroverzním tématem. Některé studie tvrdí, že osidlování dítěte bakteriemi *in utero* není možné a nálezy bakterií považují za kontaminace, které mohly vzniknout při odběru vzorku, izolaci DNA v laboratoři či kontaminovanými

reagenciemi používanými při práci se vzorky během přípravy PCR reakce a sekvenační knihovny (Leiby et al., 2018, Theis et al., 2019). Jiné studie potvrzují osidlování bakteriemi již před porodem. (Antony et al., 2015, Collado et al., 2016). Dle těchto studií má placenta vlastní unikátní mikrobiom, typický nízkou diverzitou a četností bakterií. Hlavními zástupci jsou bakterie rodu *Proteobacteria*, dalšími jsou *Prevotella*, *Neisseria* či *Fusobacterium*. Kontaminace dítěte těmito bakteriemi je údajně způsobena polykáním amniové tekutiny v placentě.

3.2.2 Kolonizace trávicího traktu během porodu

K první intenzivní kolonizaci dítěte dochází během a ihned po porodu. Trávicí trakt novorozence je v tomto období osidlován jak mikroorganismy z těla matky, tak z okolního prostředí např. ruce zdravotnického personálu, lékařské náčiní aj. To, jaké mikroorganismy se budou podílet na brzké kolonizaci střeva, závisí hlavně na způsobu porodu. Velkou roli zde hraje i doba kontaktu dítěte s matkou těsně po porodu. Na základě studií bylo prokázáno, že kontakt s fekální a vaginální mikrobiotou matky je důležitý pro kolonizaci střeva bifidobakteriemi. Děti narozené císařským řezem jsou mnohem častěji kolonizovány patogenními bakteriemi a zároveň je zde větší pravděpodobnost užívání antibiotik v prvním roce života než u dětí narozených vaginálním porodem. Rozdíly v mikrobiotě trávicího traktu, způsobené typem porodu, mohou být znatelné až do 7 let věku dítěte (Salminen et al., 2004; Dominguez-Bello et al., 2010).

3.2.3 Střevní mikrobiota mekonia

Slovem mekonium označujeme první stolici dítěte, ke které dochází cca. 1-3 den po porodu. Mekonium je typické polotuhou konzistencí a nazelenalou barvou, která je způsobena obsahem amniové tekutiny, žlučových barviv, odloučených buněk střevního epitelu a hlenu. Stejně jako v předchozí kapitole i zde máme řadu studií, které si vzájemně odporují. Studie (Ortega García et al., 2006) tvrdí, že mekonium obsahuje bakterie, jimiž bylo dítě osídleno před porodem a jedná se tedy o materiál vhodný ke zkoumání bakterií nacházejících se *in utero*. Toto tvrzení však popírá modernější studie z roku 2019 (de Goffau et al., 2019) tvrdící, že bakteriemi nacházející se v mekoniu se dítě kolonizovalo až při porodu.

Vzhledem k tomu, že bakterie, kterými je dítě kolonizováno během porodu nestihnou projít trávicím traktem dostatečně rychle, má mikrobiota mekonia nízkou bakteriální diverzitu i než je tomu u normální stolice. Právě z toho důvodu nelze prokázat vliv porodu na složení mekonia.

K zajímavým výsledkům dospěla studie (Hu et al., 2013), která zkoumala složení mekonia novorozenců narozených matkám trpících diabetem II. typu. Mekonium těchto novorozenců obsahovalo více bakterií rodu *Parabacteroides*, než mekonium novorozenců zdravých matek. Pravděpodobným zdrojem těchto bakterií je mikrobiota matek, jelikož s tímto rodem bakterií se setkáváme hlavně u diabetických pacientů.

3.2.4 Postnatální vývoj mikrobioty

K další intenzivní kolonizaci dochází v prvním půl roce života. Hlavním faktorem ovlivňující vývoj mikrobioty v tomto období je způsob stravy. Mateřské mléko díky vysokému obsahu oligosacharidů, lysozomu a dalších antimikrobiálních proteinů a probiotických bakteriálních kmenů zajišťuje všechny potřebné živiny a látky pro správný vývoj novorozence. Je prokázáno, že mateřské mléko poskytuje ochranu před infekcemi, alergiemi a přispívá k zvýšení počtu bifidobakterií ve střevě (Harder et al., 2005). Jedním z často se vyskytujících druhů je *Bifidobacterium longum*. Naopak umělá výživa vede k vyššímu zastoupení *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Bacillus fragilis* a také laktobacilů (Konig, 2011).

K dalším změnám ve složení mikrobioty dochází se zavedením běžných potravin do jídelníčku. S rozšířením skladby jídelníčku dochází k úbytku bifidobakterií, zatímco počty laktobacilů a nekultivovatelných kmenů rostou. Ke stabilizaci mikrobioty dochází zhruba ve věku 3 let (Walker, 2017).

Dle studie (Stewart et al., 2018) můžeme postnatální vývoj mikrobioty dělit do třech období: fáze vývojová (3-14 měsíc), fáze přechodná (15-30 měsíc), fáze stabilní (31-46 měsíc). Během vývojové a přechodné fáze bylo možné pozorovat hlavně dynamické změny ve složení mikrobioty které ustaly u většiny sledovaných dětí ve věku výše zmíněných tří let. Existují však i studie tvrdící, že vývoj mikrobioty trvá déle protože bakterie postupně vytváří komplexní a propojený systém, ve kterém se jednotliví členové vzájemně ovlivňují (Cheng et al., 2016; Zhong et al., 2019).

3.3 Faktory ovlivňující vývoj střevní mikrobioty

Jak jsem již zmínila výše, nejdůležitějším faktorem ve složení a vývoji střevní mikrobioty je právě způsob porodu. Dále hraje důležitou roli i typ přijímané stravy, podávání antibiotik, gestační věk, urbanizace a podávání suplementů. Faktory můžeme dělit na vnější, zahrnující zevní prostředí, stres, výživu a iatrogenní faktory, kam patří vliv možných onemocnění na mikrobiotu a aplikace medikamentů (Juránková et al., 2008).

Důležité je v průběhu prvních tří let života dbát na přirozené chování dítěte, kdy je dítě neustále vystavováno mikroorganismům z okolního prostředí, díky kontaktu úst s kůží matky, vkládáním rukou či jiných předmětů do úst, kontaktem těla se zemí při plazení a spoustou dalších činů. (Koenig et al., 2011)

V prvním roce života je hlavním externím faktorem matka, což je dáno jejich velmi blízkým kontaktem během porodu a kojením. Tento fakt byl potvrzen studií (Vaishampayan et al., 2010), která potvrdila vzájemnou funkční i fylogenetickou podobnost mikrobioty matky a dítěte během prvního měsíce života.

3.3.1 Vliv způsobu porodu na mikrobiotu

Jedním z nejvýznamnějších faktorů je způsob porodu. V dnešní době existuje řada studií zabývajících se vlivem typu porodu na mikrobiotu dítěte. Většina z nich se však shoduje na tom, že pro správný vývoj střevní mikrobioty je ideální vaginální porod. To, jak přesně se mikrobiota utváří po vaginálním porodu a císařské sekci, je popsáno v následujících kapitolách.

3.3.1.1 Porod císařským řezem

Při porodu císařským řezem dochází primárně k expozici bakteriemi nacházejícími se na kůži matky a v prostředí, což bylo potvrzeno i při rozboru stolice dětí narozených tímto způsobem. Nejvíce zastoupenými rody bývá *Staphylococcus* a *Corynebacterium*, přítomny jsou ale i *Haemophilus*, *Veillonella*, *Streptococcus* a *Enterobacter* (Dominguez-Bello et al., 2010). Střevní mikrobiota dětí narozených císařskou sekcí je specifická nízkou bakteriální diverzitou a rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium* a *Lactobacillus* jsou zastoupeny s nižší relativní četností, než je tomu u dětí narozených vaginálním porodem. Kolonizace kožními mikroorganismy může způsobit vyšší citlivost k meticilin-rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Výrazně nižší četnost rodu *Lactobacillus* přetrvává u dětí během prvních šesti měsíců života a teprve ve třech letech je rozdíl oproti dětem narozených vaginálně nulový či mizivý. V případě rodu *Bacteroidetes* dochází ke srovnání počtu zhruba ve dvou letech. Vzhledem k méně diverzifikované mikrobiotě a opožděné kolonizaci mikrobiální populací, jsou děti narozené císařským řezem častěji postiženy atopickými onemocněními nebo trpí metabolickými poruchami a často je porod císařským řezem spojován s vyšším rizikem rozvoje astmatu, celiakie či obezity (Thavagnanam et al., 2008). Další riziko plyne z kontaktu novorozence s kožními mikroorganismy během porodu, což vede ke zvýšení citlivosti na methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). U novorozenců kolonizovaných vaginální mikrobiotou je výskyt MRSA a dalších patogenů výrazně nižší. Kromě toho, císařský řez přináší i značná zdravotní rizika pro matku. Dle Gundersen et al., (2018), je tento typ porodu spojen s vyšším rizikem vzniku infekce močových cest a vzniku poporodní mateřské infekce. Z toho důvodu jsou matkám profylakticky podávána antibiotika, což představuje další riziko pro narušení střevní mikrobioty.

Jak jsem již zmínila výše, císařský porod ovlivňuje i přítomnost kmene *Bacteroidetes*, jehož zástupci produkují řadu nepostradatelných metabolitů. V případě jejich nedostatku ve střevní sliznici dochází k narušení vstřebávání cholesterolu, steatóze jater, porušení endokrinního systému nebo zánětlivým onemocněním střeva. Nejvíce zastoupeným druhem z tohoto kmene je *Bacteroides fragilis*, který byl ve vzorcích dětí narozených císařským řezem zastoupen výrazně méně než u dětí narozených přirozeně. Tato bakterie je schopna syntetizovat polysacharid A, jenž stimuluje tvorbu interleukinu 17, což je cytokin mající protizánětlivé vlastnosti (Biasucci G. a kol. 2010).



Obr. č. 2 *Bacteroides fragilis*

Důležitý je kromě počtu jednotlivých bakterií i jejich vzájemný poměr. Pro správný vývoj imunitního systému by měl být během prvního týdne života poměr kmene *Firmicutes* a

Bacteroidetes 1:1. Po porodu císařským řezem však převažuje přítomnost kmene Firmicutes, jehož zástupci pak reagují s buňkami imunitního systému a aktivací imunitní odpovědi pak může docházet k rozvoji střevních zánětů (Brumbaugh D. E. et. al., 2016).

V roce 2016 se Dominguez-Bello et. al. (2016) pokusili modifikovat mikrobiotu dítěte narozeného císařským řezem. Nechali sterilní gázu inkubovat ve vagíně matky a ihned po porodu touto gázou potřeli novorozenci ústa, tváře a zbytek těla. Následný rozbor novorozencovi stolice ukázal, že tímto způsobem byla zajištěna dostatečná expozice vaginální tekutině a mikrobiota tohoto dítěte byla shodná s mikrobiotou dítěte narozeného vaginálním porodem.

Dle WHO (2016) je až 41 milionů dětí ve věku do 5 ti let obézních, přičemž toto číslo každý rok vzrůstá, a právě porod císařským řezem bývá často označován jakožto rizikový faktor rozvoje obezity. Tento fakt, zkoumala kohortní studie (Moreno-Galarraga et. al., 2021), kde vědci shromažďovali informace od rodičů dětí ve věku 4 až 6 let pomocí online dotazníku. Průzkumu se zúčastnilo 407 jednotlivců. Výsledky ukázaly, že u dětí narozených císařským řezem se vyskytovala obezita dvakrát více než u dětí narozených vaginálně. Krom obezity je císařský řez spojován i s rizikem rozvoje astmatu. Rozvoj astmatu je vysvětlován jakožto důsledek narušení imunitního systému, ke kterému dochází z důvodu odlišného složení střevní mikrobioty u dětí narozených císařským řezem. Narušení imunity může být způsobeno i odlišnou úrovní stresu, kterou je novorozenec během porodu vystaven. Během vaginálního porodu se díky kontrakcím dělohy a hypoxii vytváří v těle novorozence velké množství kortizolu a katecholaminů, tudíž je jeho imunitní systém lépe připraven na kontakt s vnějším prostředím než imunitní systém novorozence narozeného císařskou sekcí, kde tento jev nenastává (Yassen et. al., 2019).

Některé studie však dokazují, že i novorozenec narozený císařským řezem může mít podobné složení střevní mikrobioty, jako novorozenec narozen vaginálně. Tento fakt potvrzuje studie z roku 2015, ve které autoři zkoumali 100 fekálních vzorků novorozenců, z nichž 61 bylo narozeno vaginálně a 39 se narodilo císařským řezem. Ve vzorcích jedinců narozených císařskou sekcí byly ve 41 % vzorcích detekovány bifidobakterie, jež jsou žádoucí pro svou schopnost metabolizovat oligosacharidy mateřského mléka. Vzorky vaginálně narozených dětí prokazovaly přítomnost bifidobakterií v 87 % vzorcích. Počty bifidobakterií byly u obou skupin téměř shodné. U vzorků, které neobsahovaly bifidobakterie byly v obou skupinách (narozeny vaginálně × narozeny císařskou sekcí) dominantní bakterie *E. coli*, gramnegativní anaerobní bakterie a klostridie (Musilova et. al., 2015).

3.3.1.2 Vaginální porod

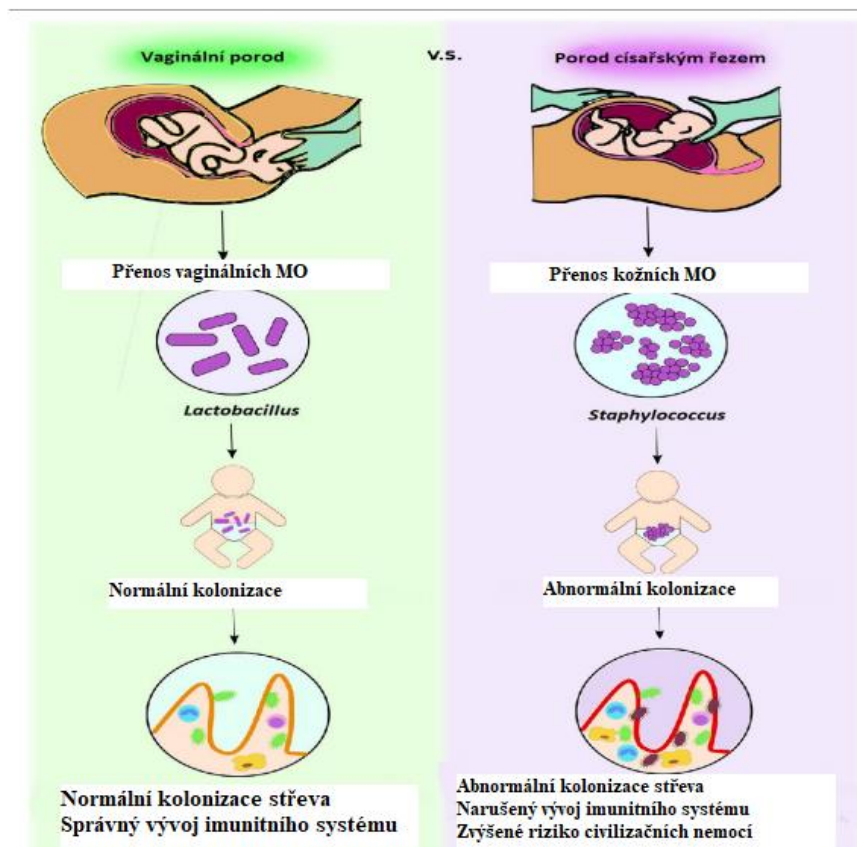
Při porodu vaginálními cestami se dítě setkává především s mikroby, běžně se vyskytujícími v porodním kanále. Ovšem i mezi dětmi narozenými vaginálně jsou rozdíly ve složení mikrobioty, dané tím, jaké mikroorganismy převládají v matčině vaginálním traktu. Většinou se setkáváme s dominancí rodu *Lactobacillus* ve střevním traktu, možná je ale i dominance rodu *Prevotella*. Dominance rodu *Lactobacillus* však není dlouhodobá, což je dáno jejich odlišnými nároky na prostředí. *Lactobacilly* jsou zvyklé na nízké pH vyskytující se ve vagíně a nedokážou mimo její prostředí dominovat nad ostatními mikroorganismy (Dominguez-Bello et al., 2010). Dalšími bakteriemi, které se běžně vyskytují ve stolici dětí narozených přirozenou cestou jsou *Bifidobacterium* a *Bacteroides*. U rodu *Bifidobacterium* byla detekována i velká druhová variabilita, nejčastěji se setkáváme s *B. breve*, *B. bifidum*, *B. adolescentis* a *B. infantis*.

V procesu kolonizace střeva je velice důležitá primární kolonizace laktobacily. Laktobacily jakožto fakultativně anaerobní mikroorganismy spotřebovávají kyslík, který těsně

po porodu zůstává v dětském střevě a brání, aby střevo bylo osídleno dalšími bakteriemi jako je *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Bacteroides* aj. Důležitou funkcí laktobacilů je i fermentace kyseliny mléčné na laktát ovlivňující pH střevního traktu. Kromě toho produkují růstový faktor, který ovlivňuje sekreci mucinu. Mucin následně reaguje se zástupci kmene *Bacteroides* a ty metabolizují jeho glykany (Brumbaugh D. E. a kol. 2016).

Druhým nejpočetnějším rodem, osidlující střevní trakt je rod *Bifidobacterium*. Jedná se o striktně anaerobní rod, proto jeho kolonizace začíná ve chvíli, kdy je veškerý kyslík ve střevě novorozence spotřebován laktobacily. Společně s kmenem *Bacteroides* se podílejí na správném vývoji imunitního systému a jsou důležitou složkou biofilmu chránící proti kolonizaci patogenními mikroorganismy jako jsou např. klostridie způsobující většinu zánětlivých onemocnění. V naší mikrobiotě se vyskytují i nepatogenní druhy klostridií např. *Clostridium butyricum* produkující butyrát, který slouží jako zdroj energie pro enterocyty (Brumbaugh D. E. a kol. 2016).

Řada studií poukazuje na důležitost vystavení dítěte mateřské stolici během porodu z toho důvodu, že mateřská stolice je zdrojem bakterií rodu *Bacteroides*, jenž by se správně měl vyskytovat v mikrobiálním profilu dítěte. Kromě rodu *Bacteroides* je možné ve stolici novorozence nalézt i stejné sérotypy bakterie *E. coli* jako ve stolici mateřské. (Chu et al., 2017) (Biasucci et al., 2010)



Obr. 2 (Dominguez-Bello et al., 2016, upraveno)

Ačkoliv považujeme způsob porodu za jeden z nejdůležitějších faktorů kolonizace střeva, výraznější změny ve složení mikrobioty nejsou patrné hned po něm a nemůžeme tedy změny sledovat v mekoniu. Výjimkou jsou pouze laktobacily, kterých bylo dle studie (Nagpal et. al.; 2016) v mekoniu dětí narozených císařským řezem detekováno pouze 6 % oproti dětem narozených přirozeně, u kterých bylo detekováno 37 % těchto bakterií. Zároveň byla ve

vzorcích pozorována i menší diverzita, detekovány byly pouze druhy *L. gasseri* a *L. brevis*. U přirozeně narozených dětí bylo detekováno celkem 7 druhů *L. gasseri*, *L. ruminis*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *L. plantarum* a *L. brevis*. K větším rozdílům ve složení mikrobioty dochází mezi třetím až sedmým dnem po porodu.

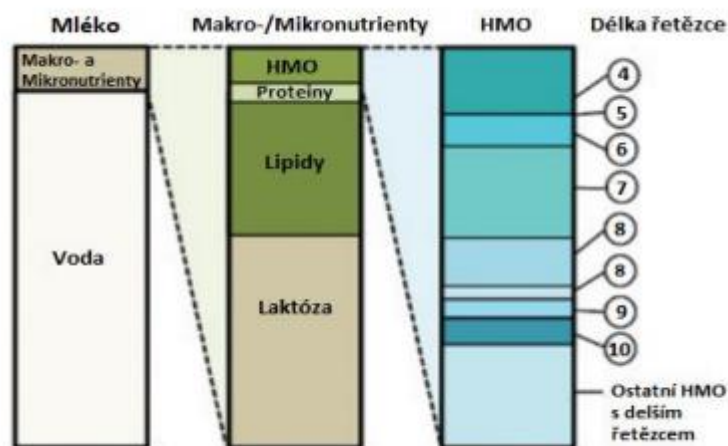
3.3.2 Vliv výživy na mikrobiotu

Jak jsem již zmínila, dalším důležitým faktorem v kolonizaci střeva a celého GIT je způsob výživy. V prvních měsících života je dětem podáváno mateřské mléko anebo jeho umělé náhražky. Právě to, jaký typ výživy zvolíme, rozhoduje o tom, jaké bakterie budou v mikrobiotě zastoupeny a jak se bude celý tento mikrobiální systém vyvíjet v prvních letech života. Větší diverzifikace dosahuje mikrobiota až se zavedením pevné stravy. (Laursen et. al., 2016)

3.3.2.1 Výživa matěřským mlékem

Mateřské mléko je jedinečná komplexní, druhově specifická, biologická tekutina, jejíž složení se mění s potřebami dítěte a dalšími faktory. Tato sloučenina plní výživové požadavky rychle rostoucího dítěte, plní funkci podpory rozvoje imunitního systému a zajišťuje i určitou ochranu proti patogenům. Mléko obsahuje všechny tři základní makroživiny. Jednou z velmi důležitých složek jsou oligosacharidy mateřského mléka (OMM), které jsou zároveň třetí nejzastoupenější složkou mateřského mléka, jsou nestravitelné a slouží tedy jako substrát pro střevní bakterie a ty je pak využívají k růstu (Andreas et al., 2015). Mateřské mléko je ojedinelé vysokým obsahem těchto oligosacharidů, jejich obsah je 12-13 g/l oproti např 40-60 mg/l nacházejících se v kravském mléce (Erney et.al., 2001; Kunz et.al., 2000).

V mateřském mléce bylo identifikováno více jak 200 druhů oligosacharidů (OMM), jež jsou složeny z jedné molekuly laktosy nebo jedné či více molekul monosacharidů, jako je D- glukosa, D- galaktosa, L- fukosa nebo N- acetylglukosamin. Přesné složení mléka ukazuje obrázek č.2 (Zivkovic et al., 2013, upraveno). Vzhledem k tomu, že se složení OMM v mléce mezi ženami liší, lze předpokládat, že i vliv na střevní bakterie bude u jednotlivých kojenců odlišný (Bode, 2015).



Obr. č. 3 (Zivkovic et al., 2013, upraveno)

Syntéza oligosacharidů mateřského mléka je podmíněna geneticky a environmentálně, probíhá v mléčné žláze, kde se díky enzymů glykosyltransferáz připojí několik monosacharidů k jádru laktózy. Komplex OMM může následně obsahovat 3 až 15 jednotek monosacharidů. Dle složení dělíme OMM na dvě skupiny, neutrální a kyselé. Neutrální OMM neobsahují kyselinu sialovou a jejich složení je podobné galaktooligosacharidům (GOS), ale na rozdíl od nich neobsahují N-acetyl-glukosamin a fukózu. Kyselé OMM obsahují navíc kyselinu sialovou. Vzhledem ke složité struktuře OMM není možné tyto látky uměle syntetizovat a jejich syntéza v těle matky nejde na rozdíl od jiných složek mateřského mléka ovlivnit dietou, ale je dána pouze geneticky (Erney et.al., 2001; Kunz et.al., 2000).

Kromě makroživin obsahuje mateřské mléko i živé organismy. Detekovány byly především bakterie kmene Firmicutes a Proteobacteria, v menší míře se zde nachází i Actinobacteria a Bacteroidetes. Nejabundantnějšími rody pak byly *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Bifidobacterium*, které se tak řadí mezi základní mikroorganismy přítomné v mléce. V nižším zastoupení pak byly detekovány *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Rothia* a *Veillonella*. (Lackey et al., 2019, Kim et al., 2020)

Mateřské mléko je zároveň zdrojem řady biologicky aktivních látek jako jsou laktoferin, lysozym, laktofericin, imunoglobuliny, laktoperoxidáza, haptokorin aj. Důležitými jsou zejména laktoferin a lysozym. Laktoferin má antibakteriální účinek, zprostředkovaný vychytáváním volného železa, které slouží jako růstový faktor pro koliformní bakterie. Lysozym má schopnost narušovat zevní buněčnou stěnu grampozitivních bakterií a společně s laktoferinem jsou schopny zabít mnohé patogenní bakterie a to tak, že laktoferin se naváže na lipopolysacharidy získané z buněčné membrány a tím vytvoří cestu pro lysozym, jenž následně degraduje vnitřní proteoglykemickou matrix, čímž usmrtí bakterii (Rada et.al, 2011).

Jak jsem již zmínila výše, u kojenců kojených mateřským mlékem, je ve střevní mikrobiotě detekován rod *Bifidobacterium*, nejčastěji pak *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. Právě tento druh je unikátní ve své schopnosti metabolizovat oligosacharidy mateřského mléka a vytvářet kyseliny s krátkým řetězcem. Oproti jiným druhům bifidobakterií (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve* atd.) je *B. infantis* schopné rozložit až 3x více OMM. Poté co OMM projdou žaludkem a proximální částí tenkého střeva, směřují okamžitě do cytoplazmy *B. infantis*, kde dojde k aktivaci řady genů účastnících se katabolismu OMM. Zpracování OMM jsou samozřejmě i ostatní druhy bifidobakterií, *B. infantis* však metabolizuje převážně menší druhy OMM (stupeň polarizace <7), které v mateřském mléce převládají (Sela et. Al., 2008).

Dle WHO (World Health Organization), se doporučuje výhradně kojení do věku 6 měsíců a doporučeno je v kojení pokračovat i při zavádění příkrmů až do věku dvou let.

3.3.2.2 Umělá výživa

Přestože je kojení mateřským mlékem nejlepší volbou výživy pro zdraví kojence, není vždy možné, a proto je nahrazováno průmyslově vyráběnými náhradami kojenecké výživy, které se snaží co nejvíce napodobit pravé mateřské mléko. (Laursen et al., 2016)

Umělá výživa může obsahovat stejně jako mateřské mléko, oligosacharidy. Zastoupeny jsou hlavně galaktooligosacharidy (GOS) a fruktooligosacharidy (FOS). Tato směs GOS a FOS zajišťuje nejlepší růstový faktor pro žádané bifidobakterie a laktobacily. Ačkoliv jsou GOS a FOS nejpoužívanější, nejsou schopny zajistit všechny funkce OMM běžně přítomných v mateřském mléku, z toho důvodu je doporučováno přidávat do umělé výživy i jiné oligosacharidy. (Verkhnyatskaya et al., 2019)

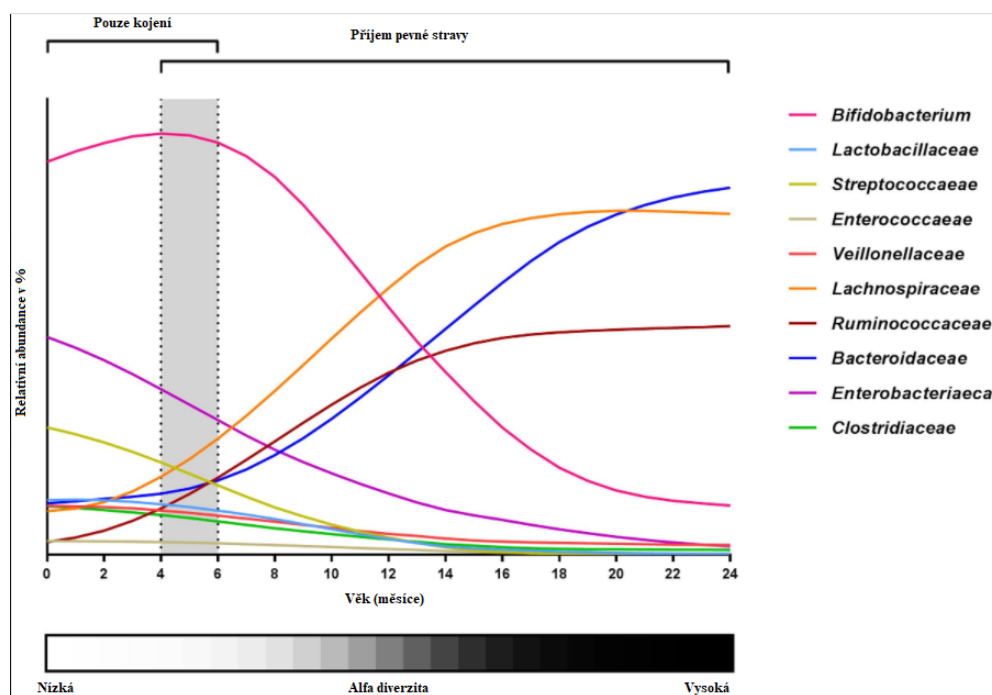
Kojenecké výživy můžeme dělit na mléka počáteční a mléka pokračovací. Počáteční mléka se běžně užívají až do věku 12 měsíců, mléka pokračovací lze užívat od 4 do 36 měsíců. Příkladem počátečního mléka na našem trhu je např. Nestlé BEBA Optipro 1, Sunar Premium 1, Nutrilon 1 Pronutra aj. Z pokračovacích formulí je to např. Nestlé BEBA Optipro 2, Sunar Premium 2, Nutrilon 2 Pronutra (Nevoral, 2003).

Konzumace umělého mléka vede u kojenců k vyšší diverzitě mikroorganismů než u dětí kojených mateřským mlékem, což však není žádoucí, protože u kojenců je nízká diverzita spojena se selekcí specifických bakterií schopných rozkládat OMM (Ma et al., 2020). Hlavními zástupci ve stolici dětí krmených umělou výživou jsou *Bifidobacterium*, následovány rodem *Streptococcus* a *Enterococcus*. Na rozdíl od dětí kojených mateřským mlékem obsahuje stolice dětí krmených umělou výživou i *B. animalis* subsp. *lactis*, který se do výživy přidává jako probiotikum. Častější je i nález bakterií *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* a *L. casei* (Laursen et al., 2016).

Konzumace náhrad mléčné výživy je spojena i s riziky, vyplývající z používání lahví. Sání mléka z láhve zvyšuje riziko onemocnění dutiny ústní, atypického polykání a často dochází k dýchání ústy, což vede k zvýšené incidenci respiračních infekcí. (Brahm et al., 2017)

3.3.2.3 Podávání příkrmů

K velké změně ve vývoji střevní mikrobioty dochází se zavedením pevné stravy do jídelníčku. Pevnou stravu začínáme podávat dětem ve věku 4 až 6 měsíců. S příjmem rozmanitým složek stravy dochází i k nárůstu bakteriální diverzity. Konzumace potravin bohatých na bílkoviny a vlákninu poskytuje bakteriím nový, velký zdroj energie a výsledkem je selektivní výhoda pro některé bakteriální druhy, které se pak ve střevě usadí a dále se množí. Úbytek mateřského mléka ve stravě vede ke snížení počtu *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* a bakterií mléčného kvašení. Naopak přítomnost rostlinných polysacharidů ve stravě vede k nárůstu počtu zástupců *Bacteroidetes* (Laursen et al., 2016). Vývoj mikrobioty po zavedení pevné stravy znázorňuje obr. č. 4.



Obr. č. 4 (Laursen et al., 2017, upraveno)

3.3.3 Vliv podávání antibiotik

Antibiotická léčba je známá svým nepříznivým vlivem na střevní mikrobiotu, který lze sledovat i několik týdnů po ukončení léčby. Antibiotika mohou ovlivnit mikrobiotu dítěte již před narozením, kdy jsou matky více náchylné k těhotenským infekcím a následná antibiotická léčba ovlivňuje jejich střevní i vaginální mikrobiotu. Takto pozměněný mateřský mikrobiom pak může ovlivnit bakteriální kolonizaci dítěte během porodu (Penders et al., 2006).

V postnatálním období jsou antibiotika nejčastěji podávána předčasně narozeným jedincům, u nichž je zvýšená pravděpodobnost rozvoje infekcí. Dle studie Zwittink et al. (2018) vede krátkodobé (<3 dny) i dlouhodobé (>5 dnů) užívání antibiotik v průběhu prvního postnatálního týdne k výraznému narušení kolonizace střeva. U jedinců, kterým byla podávána ATB došlo k výraznému poklesu počtu bifidobakterií a dominanci rodu *Enterococcus*, zatímco v případě kontrolní skupiny (bez ATB) přetrvávala dominance rodu *Bifidobacterium*. To, jak rychle se obnovila dominance rodu *Bifidobacterium*, záviselo na délce podávání antibiotik. U krátkodobého podávání trvala dominance enterokoků dva týdny a k úplnému návratu dominance rodu *Bifidobacterium* došlo nejpozději do 6 týdnů. V případě dlouhodobého užívání antibiotik trval návrat déle jak 6 týdnů.

Opakované poškozování střevní mikrobioty v prvních letech života může mít pro dítě doživotní následky. Studie (Metsälä et al., 2013) prokázala souvislost mezi užíváním širokospektrálních antibiotik a vzniku alergie na kravské mléko. Další studie poukazují i na fakt, že vyšší expozice antibiotik může vést ke vzniku astmatu, alergií či atopických ekzémů a toto riziko stoupá s délkou podávání antibiotik (Kim et al., 2018).

Velkým a v poslední době často diskutovaným problémem je antibiotická rezistence. Rezistence bakterií začíná, když bakterie mění svou odpověď na užití antibiotických léčiv, což následně vede k rozvoji závažnějších onemocnění než onemocnění, na které bakterie rezistentní nejsou. Ke vzniku rezistence dochází několika mechanismy. Buď mohou být mechanismy pro rezistenci zakódovány v chromozomální DNA nebo v extrachromozomálních mobilních genetických elementech jako jsou plazmidy a fágy. Rezistentní geny se častěji vyskytují u dětí než u jejich matek, zároveň se některé rezistentní geny vyskytují pouze u matek a některé pouze u potomků. Rezistence může vzniknout i mutací genu kódující antibiotický cíl (Duranti et al., 2017; Yassour et al. 2018).

3.3.4 Vliv gestačního věku

Gestačním věkem je míněna délka těhotenství, tedy doba od početí do porodu. Dle studie (Penders, 2006) bylo prokázáno, že u předčasně narozených dětí (narození před 38. gestačním týdnem) byla střeva častěji kolonizována *Clostridium difficile*. Další studie (La Rosa et al., 2014) prokázala u nedonošených dětí přítomnost zejména rodu *Bacillus*, bakterií patřící do třídy Gammaproteobacteria a klostridií. Přičemž později byl rod *Bacillus* a Gammaproteobacteria vytěsněn klostridiemi. Právě přítomnost těchto bakterií do 33. týdne gestačního věku byla považována za možnou příčinu předčasného porodu (Ardissone et al., 2014).

3.3.5 Vliv urbanizace

Jedná se o proces formování a rozvoje městského způsobu života. Obecně lze říci, že vyspělé státy mají větší podíl obyvatelstva žijícího ve městech než státy rozvojové. A právě mezi vyspělými a rozvojovými zeměmi byly zjištěny velké rozdíly ve složení mikrobioty. Rozdíly jsou způsobeny vyšší expozicí bakteriím již od narození. Děti se často rodí doma v nesterilním prostředí a ani zdravotnická zařízení rozvojových zemí nedosahují takových hygienických standardů, jako je tomu u nás (Fallani et al., 2010).

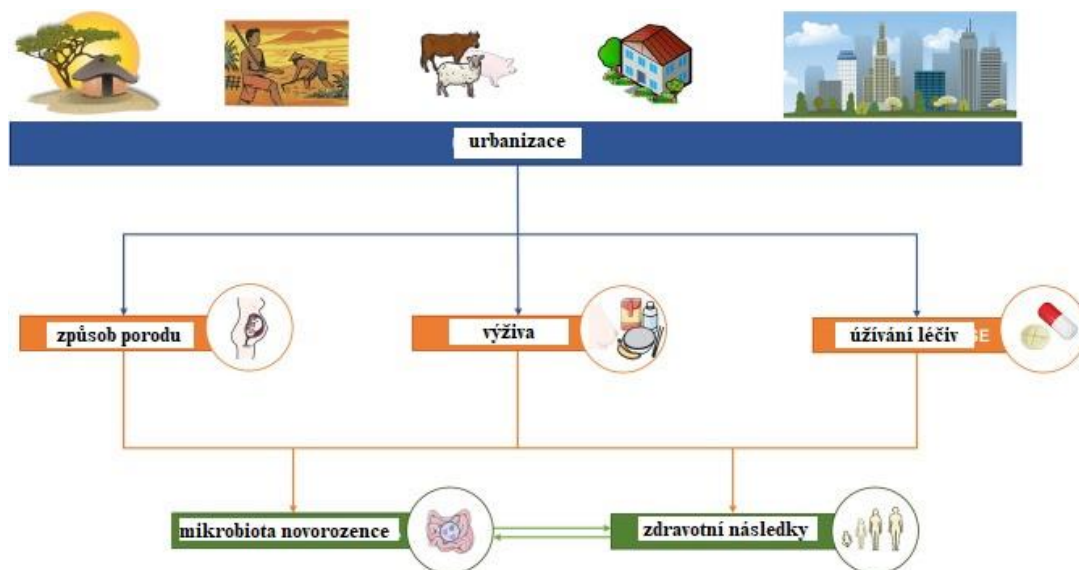
Důležitou roli zde hraje taky rozdílný typ stravy. V chudých zemích, kde převažuje strava s nízkým obsahem tuků a živočišných bílkovin, se mikrobiota vyvíjí tak, aby jedinec využil co největší množství energie ze stravy a zároveň aby ho chránila před infekcemi. Mikrobiota těchto dětí je více různorodá a jsou pro ni specifické zejména kmeny *Bacteroides* a *Actinobacteria*, zatímco *Enterobacteria* jsou zastoupeny v menším počtu než u dětí z vyspělých zemí. U jedinců z vyspělých společností jsou značně zastoupeny i kmeny *Firmicutes* a *Proteobacteria*. Přítomnost kmene *Firmicutes* je dána konzumací vysokokalorické stravy tzv. západního typu. (De Filippo et al., 2010).

Studie (Brushett et. al. 2020) se pokusila shrnout většinu faktorů spojených s urbanizací, jenž ovlivňují mikrobiotu novorozenců. Mezi hlavní faktory zařadila zvýšené množství císařských porodů, časté nahrazování mateřského mléka umělou výživou, malnutrice matek a novorozenců, nadužívání léků a jejich podávání v prvních dnech života novorozence.

Dle WHO je odhadem až 6,2 milionů císařských sekcí ročně provedeno zbytečně, přičemž největší množství císařských sekcí se provádí v Brazílii, Číně a USA. Zajímavý je i fakt, že v Brazílii je na soukromých porodnických klinikách provedeno 1,6krát více císařských sekcí než ve státních klinikách. O zdravotních rizicích spojených s císařským porodem se více zmiňují v kapitole porod císařským řezem.

V případech podávání umělé stravy, autoři poukazují hlavně na zvýšený výskyt tzv. smíšené stravy, kdy děti konzumují, jak mateřské, tak umělé mléko. Průzkumy prokázali, že ve vyspělých zemích je většině dětí od 3. měsíců podávána umělá strava v kombinaci s mateřským mlékem, což může vést k narušení střevní mikrobioty. Dalším problémem spojeným s výživou je malnutrice. Mikrobiota podvyživených dětí obsahuje vyšší množství bakterií rodu *Proteobacteria* (hlavně *E. coli*) a *Streptococcus*, naopak počty *Bacteroidetes* a anaerobních *Firmicutes* jsou oproti zdravým dětem sniženy (Million et. al., 2017). V roce 2013 provedl (Smith et.al, 2013) studii, ve které zkoumal mikrobiotu malawijských dvojčat trpících malnutricí. Mikrobiota těchto dvojčat byla oproti kontrolním zdravým dvojčatům výrazně druhově chudší a nevypělá. Autoři dále prokázali, že podání této mikrobioty gnotobiotickým myším vede k zvýšení počtu *Bilophila wadsworthia* a *Clostridium innocuum* v trávicím traktu. Tyto bakterie jsou často spojovány s rozvojem zánětlivých střevních onemocnění a narušením imunity.

Posledním faktorem, kterým se tato studie zabývala bylo nadužívání léčiv. Nadužívání antibiotik a jiných neantibiotických preparátů vede k narušení mikrobiálního prostředí ve střevě. Střevní dysbióza následně může vést k rozvoji infekcí, metabolických onemocnění jako je obezita či celkovému rozvratu metabolismu. Průzkumy dokázali, že celosvětově je správně používána pouze polovina zkonsumovaných antibiotik, což je dáno nízkou úrovní vzdělání obyvatel v oblasti zdravotnictví a v některých státech možností zakoupení antibiotik bez předpisu či na internetu (WHO, 2015). Jedním z příkladů špatného užívání léčiv je podávání kombinace antibiotik se suplementy fortifikované o železo v prevenci anémie. Tato léčba je běžně předepisovaná dětem v oblasti Subsaharské Afriky, ačkoliv často vede k průjmovým onemocněním, které jsou druhým nejčastějším důvodem úmrtí v novorozeneckém věku (Paganini et. al., 2019).



Obr. č. 5 (Brushett et. al. 2020; upraveno)

3.3.6 Vliv podávání suplementů

Dalším způsobem, jak lze ovlivnit formování mikrobioty dítěte, je podávání suplementů. Hlavními typy suplementů, které se využívají k ovlivnění mikrobioty jsou probiotika, prebiotika či jejich kombinace nazývaná synbiotika. Tyto látky pomáhají obnovit střevní rovnováhu a tím ovlivnit průběh onemocnění nebo jsou užívány v rámci prevence (Andreas, 2015).

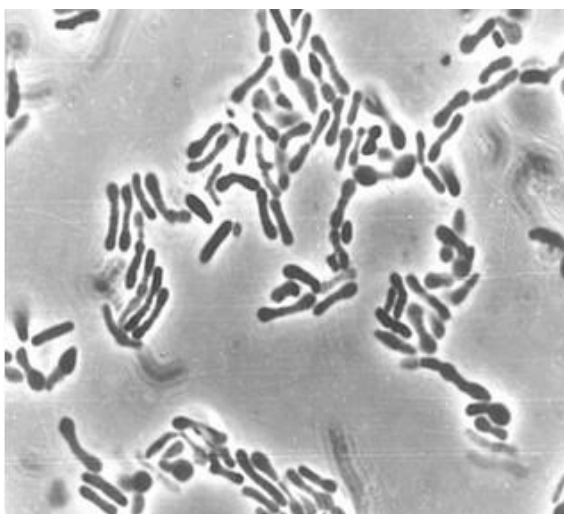
3.3.6.1 Probiotika

Probiotika definujeme jakožto živé organismy, které při podávání v dostatečném množství mají pozitivní vliv na zdraví hostitele. Aby mohl bakteriální kmen být zařazen mezi probiotika musí splňovat hned několik podmínek, musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví jedince, musí být zdravotně nezávadné, nesmí být toxické a musí být izolované ze stejného živočišného druhu jako je hostitel (Nevoral, 2005; Schellack, 2020).

Suplementy označované jako probiotika musí v každé zemi splňovat určité parametry, dané místní organizací pro kontrolu potravin a léčiv. V USA musí probiotika určená ke konzumaci mít tzv. GRAS status (Generally Recognized As Safe), který uděluje zdejší organizace pro kontrolu potravin FDA (food and drug administration). V Evropě schvaluje uvedení probiotik na trh EFSA (Evropský úřad pro bezpečnost potravin) podle tzv. QPS (Qualified Presumption of Safety). Tento koncept obsahuje kromě běžných kritérií pro hodnocení mikroorganismů i podmínky pro bezpečné užívání vycházející z historie užívání probiotik a brající v potaz možný vznik rezistence vůči antibiotikům. Níže uvádím seznam běžně používaných bakterií v probiotických preparátech (Markowiak, 2017).

Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Ostatní bakterie mléčného kvašení	Jiné mikroorganismy
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. bifidum</i>		
<i>L. helveticus</i>	<i>B. breve</i>		
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>		
<i>L. pentosus</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

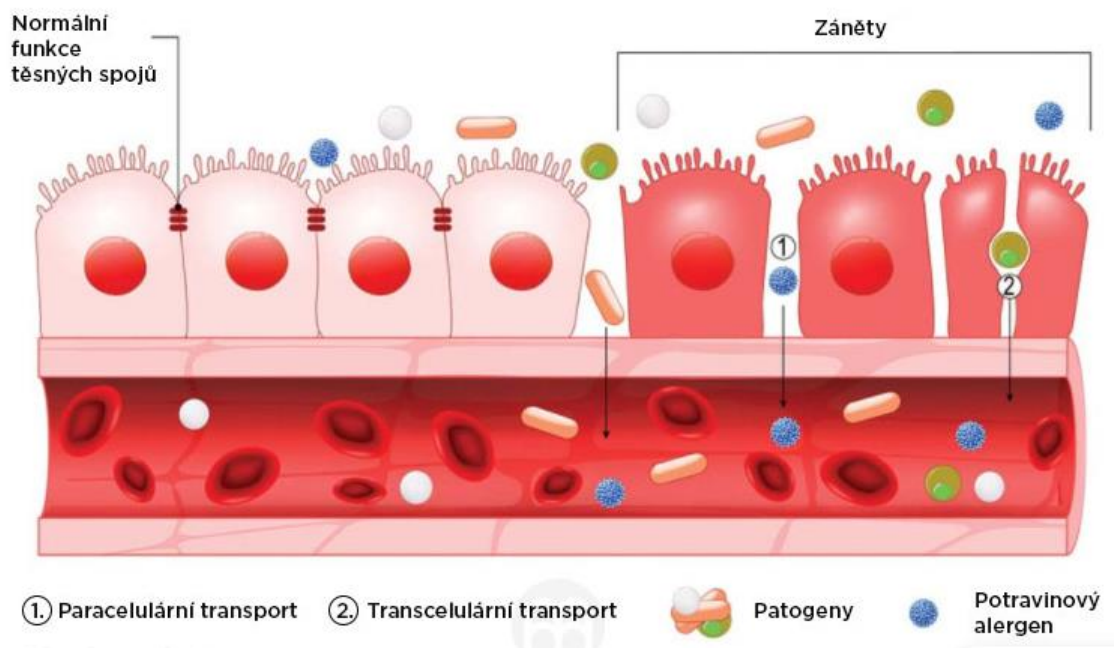
Jsou popsány tři mechanismy příznivého působení probiotik, jedná se o antimikrobiální účinky, zvýšení integrity střevní bariéry a imunitní modulaci. Maximální účinnosti probiotik dosáhneme při správném načasování podání, které je ovlivněno dynamickými změnami ve střevní mikrobiotě. V pediatrii jsou nejčastěji používanými rody bakterií *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, v menší míře jsou používány i *Propionibacterium* a *Streptococcus*. Pro příklad si můžeme uvést *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, které je nejvíce zastoupeným druhem bifidobakterií ve střevě kojenců kojených mateřským mlékem a je žádoucí pro svoji schopnost nejlépe využít oligosacharidy mateřského mléka. (Patel a DuPont, 2015; Sela et al., 2008).



Obr. č. 6 *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

Probiotika hrají důležitou roli v regulaci tzv. TJ komplexů (tight junction), které se nacházejí ve střevní stěně. TJ komplexy jsou umístěny v apikální části střevních buněk a jsou tvořeny transmembránovými proteiny. Pokud dojde k narušení exprese těchto komplexů nebo jejich posunu, dochází k vytvoření mezer, skrz které mohou do organismu pronikat cizorodé látky či mikroorganismy (Vaishnava et. al., 2008). Vztah probiotik k funkci epitelu střev dokazuje studie (Ukena a kol. 2007), kdy vědci zkoumali vliv *Escherichia coli* Nissle *in vivo*. Pokusným organismem byly laboratorní myši, kterým byla tato bakterie podána. Výsledky ukázaly, že přítomnost *Escherichia coli* Nissle ve střevní mikrobiotě zvyšuje expresi Zonula Occludens 1 (periferní membránový protein), který zlepšuje bariérovou funkci střevního epitelu a stabilizuje TJ proteiny. Kromě toho probiotika příznivě působí i na hlenovou vrstvu

nacházející se na epitelu. Jedná se o viskózní spojitou vrstvu vytvářející první řadu obrany hostitele před patogeny. Tato vrstva zabraňuje adhezi bakterií k epiteliálním buňkám a brání tak jejich vstupu do lamina propria. Důležitou složkou hlenu jsou muciny. Jedná se o glykoproteiny s vysokou molekulovou hmotností, změna jejich exprese je spojena s gastrointestinálními chorobami (např. Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida). Existují však probiotické kmeny, které mohou regulovat expresi mucinů a nepřímo tak ovlivňovat funkci imunitního systému. Příkladem může být např. *Lactobacillus plantarum* 299v, *Escherichia coli* Nissle 1917 nebo *Lactobacillus* GG (La Fata et. al., 2018).



Obr. č. 7 (Mu Q et. al., 2017; upraveno)

Některé bakteriální kmeny mají i antimikrobiální vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou asociovány s produkcí peptidů, které umožňují těmto bakteriím konkurovat ostatním druhům a chrání tak hostitele před infekčními bakteriemi a umožňují přežití prospěšných bakterií. Příkladem může být například *Lactobacillus fermentum* CS57 izolovaný z vaginálního výtěru, který produkuje látku podobnou bakteriocinu, jenž má silnou *in vitro* bakteriální aktivitu proti *Candida albicans* a *Streptococcus agalactiae*, které způsobují závažné infekce u novorozenců, při průchodu cervikálním kanálem. Další bakterií s antimikrobiálním účinkem je *Lactobacillus brevis* kmen 925A, který ovlivňuje imunitní systém prostřednictvím produkce bakteriocinu brevicin 925A, který je účinný proti *Listeria monocytogenes* a *Streptococcus mutans*, které způsobují otravu potravinami a zubní kaz (Wada et. al., 2009; Buffie et. al., 2013).

3.3.6.1.1 Podávání probiotik dětem narozených císařskou sekcí

Jedinci narození císařským řezem jsou vystaveni velkému riziku rozvoje metabolických a zánětlivých onemocnění, kvůli narušení správné střevní mikrobioty v raném období jejího vývoje. Mnoho studií však poukazuje na fakt, že při podávání probiotik dochází ke snížení tohoto rizika (Peláez et. al. 2022).

V roce 2018 provedli (Korpela et. al. 2018) metaproteomickou analýzu, ve které rozdělili novorozence do 4 skupin, narození vaginálně bez suplementace, narození vaginálně

se suplementací, narození císařskou sekcí bez suplementace a narození císařskou sekcí se suplementací. Všichni novorozenci byli krmení mateřským mlékem a nepodstoupili žádnou antibiotickou léčbu. Výsledky ukázaly velké rozdíly v metaproteomickém profilu mezi dětmi narozenými vaginálně a císařskou sekcí bez suplementace probiotiky, ovšem mezi skupinami, kterým byly podávána probiotika, rozdíly patrné nebyly. Tento fakt, potvrzuje zjištění, že v obou suplementovaných skupinách byla zjištěna vysoká indukce beta-galaktosidázy a β -galakto N-acetyl hexosaminfosforylázy (LNBP), jenž jsou součástí bifidobakteriálních enzymů důležitých v metabolizaci laktózy a oligosacharidů mateřského mléka. Vědci se dále zaměřili na to, zda suplementace probiotiky bude mít stejný účinek i u dětí krmených umělou výživou. Zatímco u kojených dětí došlo při podávání probiotik k 100 % nárůstu počtu laktobacilů a 29 % nárůstu počtu bifidobakterií, u dětí krmených umělou výživou byl patrný mírný pokles celkového počtu bifidobakterií (7 %). Jediným druhem, u kterého došlo k nárůstu, byl *Bifidobacterium breve*.

Efekt podávání probiotik novorozencům sledovala i studie (Yang et. al., 2020). Studie zkoumala fekální vzorky 26 jedinců, rozdělených do 4 skupin (narození vaginálně, narození císařskou sekcí, narození císařskou sekcí s nízkou dávkou suplementace a narození císařskou sekcí s vysokou dávkou suplementace probiotik). Vzorky byly odebrány 3, 7 a 28 den od narození. U obou skupin (s nízkou dávkou probiotik i s vysokou dávkou probiotik) byla jak α diverzita, tak β diverzita střevní mikrobioty stejná jako u dětí narozených přirozenou cestou. Abundance rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* byla patrná již třetí den podávání probiotik.

3.3.6.2 Prebiotika

Prebiotika jsou nestravitelné složky potravy, konkrétně oligosacharidy jako jsou glukooligosacharidy (GOS), fruktooligosacharidy (FOS), laktulóza a inulin, jejich funkcí je potenciálně stimulovat růst prospěšných bakterií a díky jejich rozkladu vznikají mastné kyseliny, které způsobují změnu fekálního pH, což vede ke zlepšení vstřebávání minerálních látek. Při podávání prebiotik dochází i k ovlivnění vývoje imunitního systému novorozenců (Patel a DuPont, 2015).

Prebiotika jsou často špatně označována pojmem vláknina. Rozdíl mezi vlákninou a prebiotiky spočívá v tom pro jaké organismy jsou dostupné. Zatímco prebiotika jsou fermentována přesně definovanou skupinou mikroorganismů, vláknina je využívána jakožto substrát řadou specifických střevních mikroorganismů. Abychom mohli látku klasifikovat jakožto probiotikum musí splňovat těchto 5 podmínek: musí být nestravitelná nebo pouze částečně stravitelná v našem trávicím traktu, musí být využitelné pro žádoucí bakterie střevní mikrobioty, jejich fermentací musí vznikat mastné kyseliny s krátkým řetězcem ovlivňující střevní pH, dále musí docházet k imunomodulaci a musí odolávat působení trávicích procesů (Markowiak, 2017).

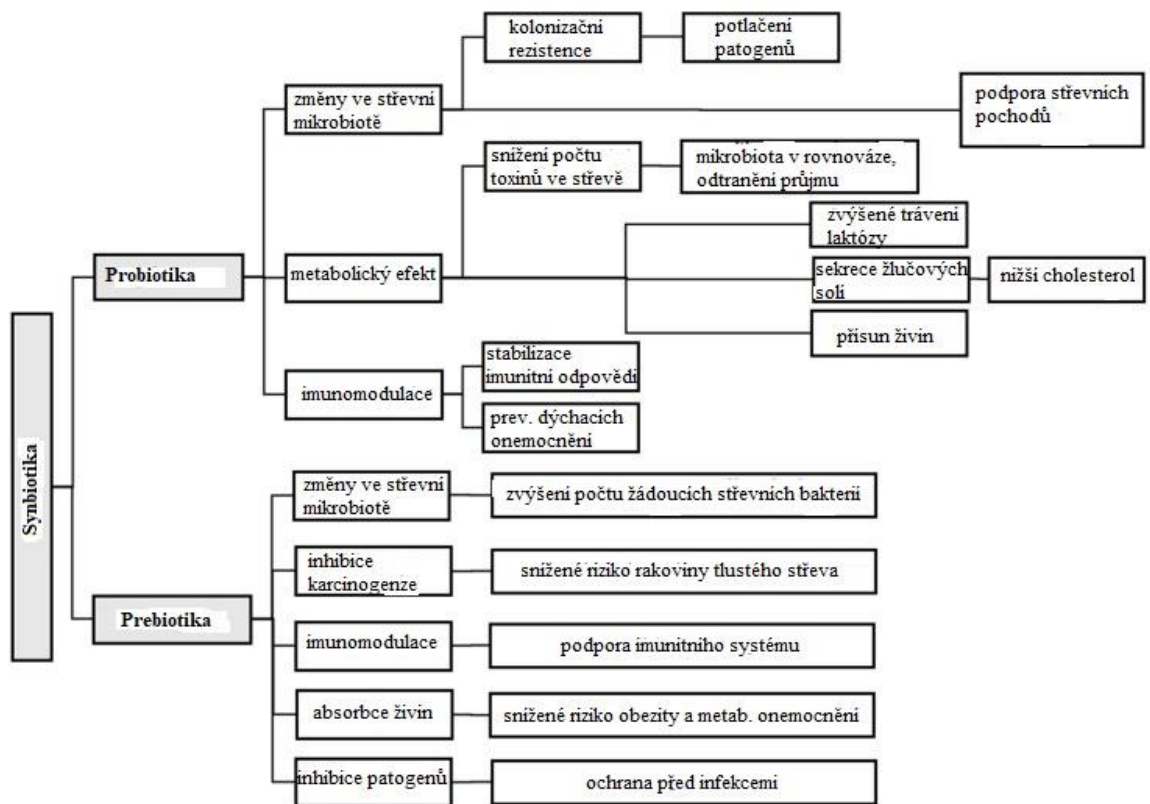
Mechanismus působení prebiotik zůstává stále nejasný. Existuje však několik teorií jak prebiotika dosahují pozitivního vlivu na hostitele. První z nich tvrdí, že prebiotika jsou schopna ovlivnit aktivitu jaterních lipogenních enzymů, pomocí tvorby mastných kyselin s krátkým řetězcem jako je například kyselina propionová. Další uvádí produkty fermentace zejména pak kyselinu máselnou jakožto modulátor histonové acetylace, což zvyšuje dostupnost řady genů pro transkripční faktory. Benefitních účinků může být dosaženo i pomocí regulace tvorby mucinu. Prokázáno bylo i zvýšení tvorby lymfocytů a leukocytů v lymfatické tkáni spojené se střevem a v periferní krvi, při podávání fruktooligosacharidů (FOS). Poslední možný mechanismus tvrdí, že zvýšená produkce IgA (vytvářející lymfatickou tkáň střev) stimuluje fagocytózu protizánětlivých makrofágů (Schley et. al. 2002).

Prvními prebiotiky se kterými se novorozenec setkává jsou oligosacharidy mateřského mléka (OMM), podporující růst především bifidobakterií. Bifidobakterie následně v tlustém střevě způsobují inhibici vazby toxinů a patogenů na epitelové buňky, čímž chrání kojence před patogeny a infekcemi. Kromě toho má podávání prebiotik pozitivní efekt v prevenci průjmů a diabetes mellitus II. typu (Kobata, 2010). OMM působí nárůz od jiných komerčně používaných probiotik jako jsou inulin, polydextrosa, fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy mnohem specifičtěji, díky čemuž podporují výskyt bifidobakterií ve střevě. V umělé stravě se výrobci snaží nahradit OMM směsí GOS a FOS v poměru 9:1, tato směs však není plně selektivní a může podporovat růst patogenních bakterií (Asakuma et. al., 2011).

3.3.6.3 Synbiotika

Kombinací probiotik s prebiotika vznikají synbiotika. Cílem této kombinace je usnadnění přežití probiotik v in vivo podmínkách. Prebiotikum jakožto sacharid selektivně metabolizuje probiotikum, čímž dochází ke stimulaci prospěšné mikrobioty (Patel and DuPont, 2015).

Hlavními benefity podávání synbiotik jsou navýšení počtu laktobacilů a bifidobakterií ve střevě, vytvoření balance mezi mikroorganismy osídlující střevo, podpora funkce jater, zlepšení imunomodulace a prevence nozokomiálních infekcí. Kromě toho mají i antibakteriální efekt, antikarcinogenní efekt, či antialergický efekt. Některé studie prokázaly i efekt v prevenci osteoporózy, vysokého krevního cukru a cholesterolu nebo léčbě mozkových poruch (Markowiak, 2017). Mechanismus působení synbiotik popisuje detailněji Obr. č.5 (Markowiak, 2017, upraveno).



Obr. č. 8 (Markowiak, 2017, upraveno)

Poté, co řada studií prokázala efekt prebiotik a probiotik, začaly se mnohé studie zabývat podáváním synbiotik. Jedna z těchto studií zkoumala efekt podávání synbiotik u dětí narozených císařskou sekcí. Studie zkoumala fekálních vzorky 153 donošených novorozenců, kteří z různých důvodů nemohli být kojeni. Novorozencům byla po dobu 16 týdnů podávána kombinace probiotik a prebiotik v podobě scFOS/IcGOS s *Bifidobacterium breve* M16-V. Při podávání těchto synbiotik došlo k výraznému zvýšení počtu tohoto probiotického kmene již od 3. dne suplementace. Kromě toho došlo i ke snížení počtu enterobakterií, snížení fekálního pH a zvýšení acetátu ve stolici. Takto modifikovaná mikrobiota byla již srovnatelná se složením mikrobioty dětí narozených vaginálně. Vědci se i pokusili vystavit děti peptidovým derivátům z β -laktoglobulinů obohacených o směs scFOS/IcGOS s *Bifidobacterium breve* M16-V, což vedlo k redukci akutní alergické reakce na syrovátku a zároveň to pomohlo k udržení fyziologické rovnováhy Th1/Th2 lymfocytů v tenkém střevě (CHua et. al., 2017).

Ve roce 2013 Danq et al. provedli metaanalýzu dat ze studií zkoumající efekt synbiotik a probiotik na rozvoj ekzému a alergie u dětí. Bylo zjištěno, že podávání synbiotik nebo probiotik může snížit výskyt ekzému u dětí do 2 let.

Určitě je důležité zmínit, že ne každá kombinace probiotika s prebiotikem má synergický efekt, jenž je od synbiotik očekáván. Jako příklad si můžeme uvést dvojici *Lactobacillus casei* a oligofruktózu, ačkoliv se jedná o probiotikum a prebiotikum, tak *Lactobacillus* není schopen metabolizovat oligofruktózu, nedochází tedy k synergickému účinku. Abychom dosáhli synergismu bylo by nutné *Lactobacillus casei* nahradit za např. *Bifidobacterium*, jenž je schopno oligosacharidy metabolizovat. V běžné stravě se s touto kombinací setkáváme hlavně u zakysaných mléčných výrobků. Dalšími běžně užívanými synbiotiky jsou dvojice laktobacily – inulin nebo lakcitol, *L. rhamnosus* – inulin, bifidobakterie – GOS nebo FOS (Patel and DuPont, 2015). Příkladem dobrého synbiotického produktu je probiotický kmen *S. cerevisiae* doplněn o organický selen. Pokusy na myších trpících revmatoidní artritidou vedly ke snížení zánětlivých faktorů, jako je infiltrace zánětlivými buňkami a produkce prozánětlivého cytokinu.

3.3.6.4 Postbiotika

Za zmínku rozhodně stojí i tzv. postbiotika. Termínem postbiotika označujeme vlastní nebo sekundární metabolity střevních bakterií. Je prokázáno, že imunomodulační aktivita bakterií je spojena s jejich vlastními metabolity. Postbiotiky jsou tedy metabolické sloučeniny produkované probiotickými bakteriemi ovlivňující biologické funkce hostitele. Dobrým zdrojem postbiotik jsou například fermentované mléčné výrobky obsahují živé či usmrcené bakterie, jejich fragmenty, mikrobiální metabolity nebo obsah jejich cytosolu, tedy bílkoviny, peptidy, aminokyseliny, sacharidy, vitamíny atd. Ačkoliv jsou tyto látky zastoupeny poměrně v nízkém množství, vykazují funkční vlastnosti vznikající jejich reakcí se střevním epitelem. Studií, jenž zkoumají efekt postbiotik na naše zdraví zatím nebylo mnoho provedeno, i přesto se ale podařilo prokázat některé z jejich benefičních účinků na naše zdraví. Postbiotika mohou vykazovat jak na lokální, tak na systémové úrovni, antimikrobiální, protizánětlivou, imunomodulační, anti-obezogenní, anti-hypertenzní, hypocholesterolemickou či antiproliferační aktivitu (Roy et. al., 2004).

Již v 50 letech minulého století se začaly vyrábět fermentované kojenecké formule, tyto formule jsou vyráběny fermentací formulí na bázi kravského mléka, díky specifickým bakteriálním kmenům produkující kyselinou mléčnou. Během výroby dochází pouze k mírnému zahřátí, takže výsledné produkty neobsahují žádné živé bakterie ale pouze produkty fermentace. Studie zaměřené na účinky fermentovaných formulí s probiotiky se zaměřovaly převážně na příznaky gastrointestinálního diskomfortu. Mezi příznaky

gastrointestinálního diskomfortu patří ublinkávání, flatulence, meteorismus, kojenecké koliky atd. Mechanismus účinku u refluxních potíží je vysvětlován vlivem na urychlení vyprázdňování žaludku a zahuštěním žaludečního obsahu. Nadýmání je ovlivněno přítomností bakteriální laktázy, inhibicí proteáz, modifikací střevní mikrobioty a protizánětlivým působením bakteriálních metabolitů. Bohužel pouze jedna studie prokazuje, že fermentované formule mohou snížit dopady infekčních průjmů u zdravých dětí. Studie z roku 2004 (Thibault et. al., 2004) porovnávala dvě skupiny dětí, jedné skupině byly podávány fermentované kojenecké formule, druhé skupině byly podávány standardní kojenecké formule. Výsledky neprokázaly u první skupiny změnu v počtu průjmových epizod vyžadující hospitalizaci ani v celkovém počtu průjmových epizod. Změny byly sledovány pouze ve snížení počtu průjmů vedoucích k dehydrataci. Jiná studie však prokázala výrazné snížení gastrointestinálního diskomfortu a snížení intenzity meteorismu (Roy et. al., 2004).

4 Materiál a metodika

4.1 Kojenci

Zkoumanými kojenci byla dvojčata narozená císařským řezem dne 1.8.2014 v porodnici Praha Motol. Kojencům byla již od narození podávána probiotika Biopron, po třech týdnech byla dvojčata převezena do nemocnice Praha Krč, kde jim byla podávána probiotika BioGaia obsahující *Lactobacillus reuteri* až do 28.10.2014 kdy jim byla opět nasazena probiotika Biopron. Oba kojenci byly plně kojeni. U kojence 1 bylo podezření na alergii na bílkoviny mléka, z důvodu nálezu krve ve stolici. Ve věku 3 měsíců byly kojencům zařazeny do diety Beba kaše od firmy Nestlé obsahující *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

4.2 Odebrání a příprava vzorků

Vzorky stolice byly pravidelně odebírány po dobu 7 let. Čerstvé vzorky byly asepticky převedeny do zkumavek, následně byly převezeny do laboratoře a zde byly podrobeny analýze. Vzorky byly sériově 9x ředěny za anaerobních podmínek (z každého ředění odebrán 1ml vzorku).

4.3 Příprava médií a kultivace

Agar byl připraven smícháním WCH 43 g/l, sojového peptonu 5 g/l, L-cysteinu 0,5 g/l a 1 ml/l tweenu v destilované vodě. Tato směs byla přivedena k varu a všechny složky se nechaly rozpustit. Poté byl agar sterilován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut a následně byl ještě vytemperován na 50 °C ve vodní lázni. Po srovnání teplot byla k agaru přimíchána antibiotika vhodná pro jejich následnou selektivní úpravu.

Pro G- (gramnegativní) bakterie byl připraven Wilkins-Chalgren agar se sojovým peptonem, krví a G-suplementem. Byl připraven základní agar bez přídavku tweenu. Po jeho vytemperování na teplotu 50 °C bylo přidáno 5 ml krve (Laked horse blood, Thermo Fisher Scientific) na 100 ml média a 2 ml G-supplementu (G-Anaerobe Selective Supplement, Thermo Fisher Scientific) na 100 ml média.

Na stanovení bifidobakterií byl použit modifikovaný Wilkins-Chalgren agar, který byl připraven přídavkem 100 mg/l mupirocinu a 1ml/l kyseliny octové. Protože médium není dostatečně selektivní, pokud stolice obsahuje vyšší koncentraci klostridií a menší koncentraci bifidobakterie byl dále pro stanovení bifidobakterií použit Wilkins-Chalgren agar s norfloxacinem 200mg/l, mupirocinem 100 mg/l a 1ml/l kyseliny octové.

Na přípravu Rogosa agaru pro laktobacily bylo 6,9 g agaru rozmícháno ve 100 ml destilované vody, tato směs se nechala povařit, dokud nebyly rozpuštěny všechny složky agaru. Po 20 minutách, když byl agar rozvařen, se do něj přidalo 0,132 ml 98% kyseliny octové a médium se nechalo dalších 2 minuty povařit. Následně bylo médium umístěno do vodní lázně o teplotě 50°C.

TBX agar pro *E. coli* byl připraven rozmícháním 3,66 g TBX média ve 100 ml destilované vody, poté byl přiveden k varu, aby se rozpustili všechny složky media. Následně byl agar vysterilován v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C a po sterilaci byl vytemperován na teplotu 50 °C ve vodní lázni, poté byl přelit do sterilních Petriho misek a nechal se zatuhnout.

Pro stanovení enterokoků bylo použito Slanetz-Bartley medium, které bylo připraveno rozmícháním 4,2g Slanetz-Bartley média ve 100 ml destilované vody. Tato směs byla přivedena k varu, dokud se nerozpustili všechny složky média. Po rozvaření médium získalo zlatou barvu. Po vytemperování na 50 °C se médium nalilo do sterilních Petriho misek a nehalo se zatuhnout.

Ředící řada byla připravena následovně. Narostlá kultura byla pomocí ředícího roztoku zředěna tak, že byl nabrán 1 ml vzorku do ředícího roztoku, čímž vzniklo ředění 10^{-1} , tímto způsobem se pokračovalo dál (z ředění 10^{-1} se odebralo 1 ml vzorku do ředícího roztoku a vzniklo ředění 10^{-2} atd.). Pokračovalo se až do ředění 10^{-9} .

Média pro ředící řadu byla připravena pomocí tzv. role tube techniky v anaerobním prostředí. Naředěné vzorky byly přemístěny do sterilních Petriho misek, které byly okamžitě zalaty selektivními medii. Pro stanovení celkového počtu anaerobních bakterií byl použit Wilkins-Chalgren agar (WCH) Oxoid, pro bifidobakterie WCH agar modifikovaný přidáním 100 mg/l mupirocinu, 1 ml/l kyseliny octové (bifidobakterie MUP) nebo 100 mg/l mupirocinu a norfloxacin s kyselinou octovou (bifidobakterie NOR), pro laktobacily byl použit Rogosa agar Oxoid a pro gramnegativní anaeroby byl použit Wilkins-Chalgren agar modifikovaný G-N anaerobním selektivním doplňkem, pro *Escherichia coli* bylo použito chromogenní médium TBX (Oxoid), které bylo nalito do sterilních Petriho misek (průměr 10 ml) a po zatuhnutí na něj byla zaočkována jednotlivá ředění (0,1 ml) a byla rozetřena po zatuhlém médiu pomocí očkovací hokejky. U bifidobakterií MUP a NOR bylo nutné antibiotika, tedy mupirocin, dát dopředu louhovat do zkumavky s bujónem na dobu 30 minut. Následně byly bifidobakterie a anaerobní bakterie inkubovány v anaerostatech (Anaerobic plus systém, Oxoid) při 37 °C po dobu 48 h. Laktobacily byly inkubovány víčkem dolů při 37 °C po dobu 3 dnů za mikroaerofilních podmínek, čeho jsme dosáhli tím, že jsme misky po naočkování ještě jednou přelili médiem a *E. coli* byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Pro kultivaci enterokoků bylo použito Slanetz-Bartley agar (Oxoid). Kultivace enterokoků probíhala za aerobních podmínek v termostatu při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

4.4 Vyhodnocení rozboru

Poté co byla dokončena kultivace, byly Petriho misky rozloženy dle schématu na pracovní stůl a pomocí digitálního počítadla byly na počitatelných ředění spočítány počty narostlých kolonií. Spočítané kolonie u laktobacilů, bifidobakterií a celkových počtů bakterií musely být vynásobeny dvakrát, protože jejich inokulační dávka byla 0,5ml a byly naneseny na malé Petriho misky. U bakterií, u kterých byl použit TBX agar byl celkový počet vynásoben 10x, protože bylo očkováno 0,1 ml.

Konečný výsledek byl vypočítán dle tohoto vzorce:

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

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

F – převrácená hodnota nejvyššího ředění

KTJ – kolonie tvořící jednotka

Výsledek vyjadřoval přesný počet kolonií tvořící jednotku v 1 g zkoumaného vzorku stolice.

4.5 Izolace kolonií

Po kultivaci byly z Petriho misek pomocí bakteriologické kličky odebrány vybrané kolonie. Kolonie se odebírali z každého druhu média. Kolonie byly za sterilních podmínek vloženy do zkumavek obsahující tekutý modifikovaný Wilkins-Chalgren bujón (WCHB), jenž byl připraven za anaerobních podmínek. Tento bujón se skládal z 33 g/l WCHB, 5 g/l sojového peptonu, 0,5 g/l L-cysteinu a 1 ml/l tweenu. Z médií pro stanovení bifidobakterií bylo odebráno do 10 kolonií podle variability kultivačních charakteristik. Následně se zkumavky s izoláty nechaly kultivovat při 37 °C po dobu 24 hodin.

4.6 Výběr vzorků a analýza MALDI-TOF

Poté co byly izoláty kultivovány, bylo nutné vybrat vhodné vzorky pro další analýzu pomocí zařízení MALDI-TOF. Jednotlivé izoláty byly pomocí injekčních stříkaček naneseny na podložní sklíčko a překryty krycím sklíčkem, poté byly vloženy pod světelný mikroskop s fázovým kontrastem. Kontaminované vzorky byly vyřazeny a použily se pouze ty vzorky, které prokazovaly největší variabilitu, byly čisté a jednotné. Pod mikroskopem byly vzorky zvětšeny a u některých byl proveden i digitální snímek. Vybrané vzorky byly označeny číselnými kódy pro lepší orientaci.

Z označených vzorků bylo odebráno pomocí injekční stříkačky 1 ml kultury do uzavíratelných eppendorf zkumavek o objemu 1,5 ml, které byly označeny stejným kódem jako kultury. Tyto kultury byly vloženy do centrifugy a stočeny při 14500 otáčkách po dobu 2 minut, čímž jsme docílili odstředění a usazení sedimentu na dno eppendorfy. Z eppendorfy byl slit supernatant a na dně zůstala tzv. peleta. Pelety byly odebrány a smíchány pipetou s 500 µl 70 % ethanolu. Poté byly opět zkumavky dány do centrifugy a následně byl ethanol slit. Zbytky ethanolu byly opatrně odpipetovány, aby nebyly poškozeny pelety. Zkumavky byly 10 minut ponechány, aby vyschly. Po vyschnutí bylo do zkumavek přidáno 15 µl kyseliny mravenčí (Sigma Aldrich) a 15 µl 100 % acetonitrilu. Následně byly vzorky homogenizovány pomocí vortexu a stočeny. Na stříbrnou destičku od firmy Bruker bylo naneseno 1 µl tekuté složky výsledného supernatantu. Poté, co supernatant na destičce zaschnul, bylo na destičku pipetou naneseno 1 µl HCAA (kyselina α – kyano – 4 - hydroxysořicová) matrice, která se opět nechala zaschnout. Poté byla stříbrná destička vložena do zařízení MALDI-TOF, kde proběhla analýza a identifikace nanesených vzorků.

Zařízení funguje na základě ozáření vzorku laserem, kdy je vzorek ionizován a na základě doby letu ionizovaných proteinů jsou pak bakteriální kmeny identifikovány pomocí databáze mikroorganismů. Ukazatelem přesnosti identifikace mikroorganismu je tzv. skóre na škále od 0 do 3. Hodnota 0-1,699 znamená nespolehlivou identifikaci, hodnota 1,700- 1,999 znamená pravděpodobná identifikace na úrovni rodu; 2,000-2,999 znamená jistá identifikace na úrovni rodu a pravděpodobná na úrovni druhu; 2,300-3,000 značí velice pravděpodobnou identifikace na úrovni druhu.

5 Výsledky

5.1 Rozbor střevní mikrobioty

Ve vzorcích kojenecké stolice byly měřeny tyto hodnoty: celkové počty, gram negativní bakterie, *Bifidobacterium* NOR, *Bifidobacterium* MUF, *Lactobacillus*, *E. coli*, koliformní bakterie a enterokoky, u prvního rozboru došlo i k detekci klostridií. V tabulce jsou uvedeny počty stanovených skupin bakterií, zjištěné při jednotlivých měřeních. Hodnoty jsou vyjádřeny v logaritmech KTJ (kolonie tvořící jednotku) v 1 g stolice. Pro každého kojence byla vytvořena tabulka zvlášť. V případě, že ve vzorku nebyl detekován daný druh bakterie, je v kolonce napsáno ND (nedetekováno) protože počet bakterií byl nižší než detekční limit (<2 KTJ/g) a hodnota nebyla použita v navazujících grafech a tabulkách. Analýza pomocí přístroje MALDI-TOF detekovala bakteriální druhy *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum* v rozboru z 15.06.2021 Výsledky analýzy MALDI-TOF viz příloha č. 1.

Tab. č. 1 Souhrnná tabulka Kojenec 1

datum rozboru	CP	G-	Bif MUP	Bif NOR	klostridie	Lb	E. coli	koliform	ENT
28.08.2014	9,73 ± 0,05	9,48 ± 0,03	ND	ND	7,42 ± 0,02	6,13 ± 0,06	9,78 ± 0,00	ND	9,01 ± 0,06
23.09.2014	10,23 ± 0,08	9,15 ± 0,00	9,74 ± 0,01	9,94 ± 0,00	ND	7,21 ± 0,05	9,01 ± 0,03	9,27 ± 0,03	7,86 ± 0,08
29.9.2014	10,60 ± 0,00	9,83 ± 0,00	10,41 ± 0,00	10,23 ± 0,00	ND	7,18 ± 0,17	9,27 ± 0,01	8,00 ± 0,00	9,44 ± 0,25
10.10.2014	10,64 ± 0,00	10,12 ± 0,47	10,53 ± 0,00	10,45 ± 0,00	ND	9,50 ± 0,00	9,42 ± 0,05	9,29 ± 0,01	8,95 ± 0,10
15.10.2014	10,60 ± 0,00	10,34 ± 0,00	10,69 ± 0,00	10,75 ± 0,00	ND	8,79 ± 0,42	9,19 ± 0,58	ND	10,06 ± 0,54
21.10.2014	10,02 ± 0,25	9,52 ± 0,01	9,89 ± 0,01	10,08 ± 0,06	ND	9,27 ± 0,01	9,32 ± 0,02	ND	9,37 ± 0,19
01.11.2014	10,66 ± 0,00	9,73 ± 0,05	10,42 ± 0,03	10,34 ± 0,00	ND	8,67 ± 0,32	9,82 ± 0,11	8,81 ± 0,16	10,21 ± 0,19
07.11.2014	10,58 ± 0,00	10,29 ± 0,05	10,62 ± 0,00	10,32 ± 0,13	ND	8,23 ± 0,06	9,07 ± 0,06	9,90 ± 0,00	9,64 ± 0,23
28.11.2014	10,62 ± 0,00	9,94 ± 0,01	10,41 ± 0,00	10,60 ± 0,00	ND	8,81 ± 0,03	9,25 ± 0,64	9,47 ± 0,11	9,50 ± 0,17
15.12.2014	10,58 ± 0,00	9,76 ± 0,01	10,23 ± 0,03	9,85 ± 0,23	ND	6,78 ± 0,00	9,72 ± 0,24	9,00 ± 0,00	9,88 ± 0,02
14.01.2015	9,00 ± 0,00	8,41 ± 0,10	8,00 ± 0,00	ND	ND	ND	8,35 ± 0,04	8,53 ± 0,20	ND
20.01.2015	10,58 ± 0,00	8,80 ± 0,17	10,51 ± 0,00	9,91 ± 0,00	ND	ND	7,67 ± 0,10	ND	7,55 ± 0,21
26.09.2016	10,16 ± 0,05	8,77 ± 0,41	10,06 ± 0,02	8,92 ± 0,07	ND	ND	7,45 ± 0,15	ND	7,06 ± 0,06
15.06.2021	10,09 ± 0,05	8,86 ± 0,01	10,06 ± 0,02	9,76 ± 0,15	ND	ND	ND	ND	ND

(CP- celkové počty, G- gramnegativní bakterie, Bif MUP a NOR- bifidobakterie mupirocin a norfloxacin, Lb- laktobacily, koliform- koliformní bakterie, ENT- enterokoky)

Tab. č. 2 Souhrnná tabulka Kojenec 2

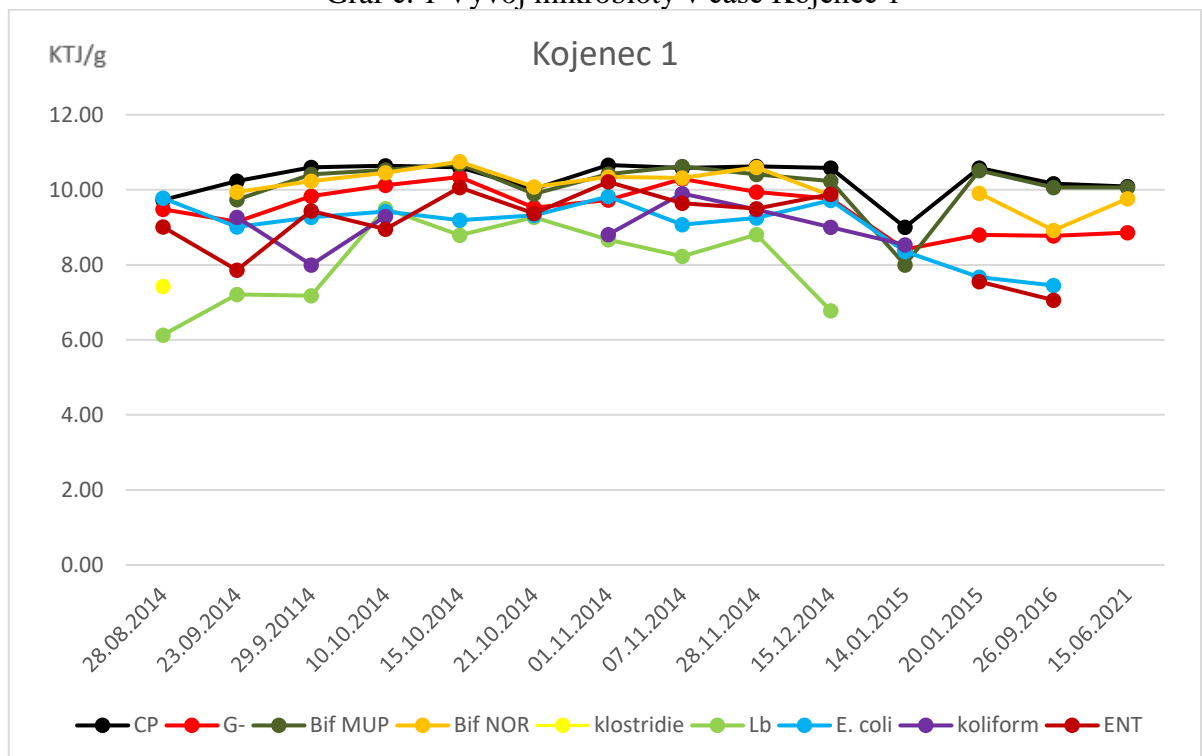
datum rozboru	CP	G-	Bif MUP	Bif NOR	klostridie	Lb	E. coli	koliform	ENT
28.08.2014	9,77 ± 0,11	8,50 ± 0,03	ND	ND	8,32 ± 0,04	6,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	ND	7,74 ± 0,19
23.09.2014	11,02 ± 0,00	9,82 ± 0,00	10,03 ± 0,00	9,98 ± 0,00	ND	7,09 ± 0,08	9,54 ± 0,55	6,30 ± 0,00	8,42 ± 0,37
29.9.2014	10,73 ± 0,00	10,00 ± 0,00	10,58 ± 0,00	10,40 ± 0,00	ND	9,49 ± 0,04	9,04 ± 0,22	8,15 ± 0,00	9,09 ± 0,17
10.10.2014	10,24 ± 0,10	9,53 ± 0,08	10,43 ± 0,00	10,85 ± 0,52	ND	9,12 ± 0,12	9,17 ± 0,42	8,79 ± 0,22	9,42 ± 0,06
15.10.2014	10,53 ± 0,00	10,58 ± 0,00	10,07 ± 0,00	9,94 ± 0,00	ND	9,72 ± 0,00	9,97 ± 0,03	9,20 ± 0,09	9,58 ± 0,09
21.10.2014	10,53 ± 0,00	10,25 ± 0,05	10,62 ± 0,00	10,60 ± 0,00	ND	9,72 ± 0,00	9,90 ± 0,10	7,94 ± 0,05	9,77 ± 0,12
11.11.2014	10,18 ± 0,10	9,98 ± 0,02	10,72 ± 0,00	10,68 ± 0,00	ND	9,31 ± 0,01	9,46 ± 0,17	9,18 ± 0,00	9,31 ± 0,27
07.11.2014	10,68 ± 0,00	9,85 ± 0,07	10,46 ± 0,04	10,78 ± 0,00	ND	9,37 ± 0,04	9,70 ± 0,00	9,30 ± 0,00	9,74 ± 0,03
28.11.2014	10,64 ± 0,00	9,74 ± 0,04	10,58 ± 0,00	10,41 ± 0,00	ND	9,32 ± 0,02	9,63 ± 0,03	9,82 ± 0,23	9,76 ± 0,07
15.12.2014	10,90 ± 0,00	10,22 ± 0,02	10,66 ± 0,00	10,75 ± 0,00	ND	8,08 ± 0,15	10,14 ± 0,00	10,61 ± 0,00	9,87 ± 0,18
14.01.2015	9,30 ± 0,00	ND	6,78 ± 0,00	ND	ND	ND	8,53 ± 1,41	ND	7,18 ± 0,13
20.01.2015	10,02 ± 0,02	8,36 ± 0,22	10,00 ± 0,08	9,87 ± 0,00	ND	6,85 ± 0,34	8,30 ± 0,00	7,03 ± 0,02	7,21 ± 0,24
26.09.2016	9,96 ± 0,08	8,99 ± 0,23	9,98 ± 0,11	9,31 ± 0,06	ND	ND	8,03 ± 0,03	ND	7,22 ± 0,21
15.06.2021	10,10 ± 0,08	8,59 ± 0,09	9,89 ± 0,16	9,59 ± 0,20	ND	ND	ND	ND	ND

5.2 Vývoj mikrobioty kojenců v čase

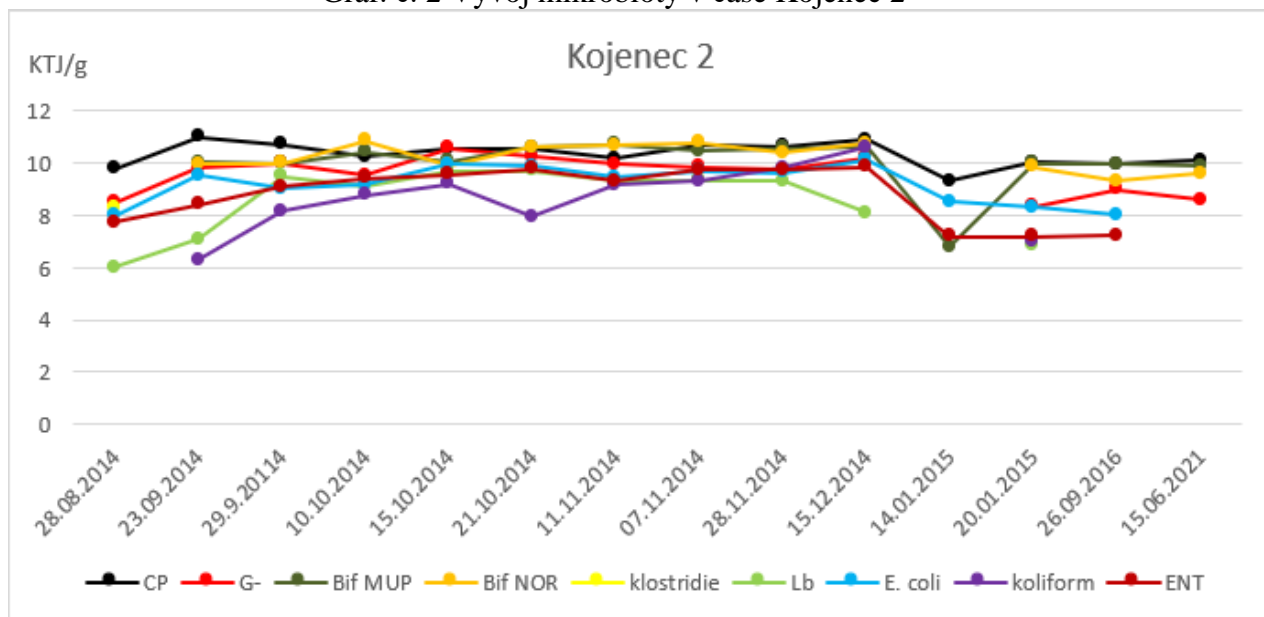
Vývoj mikrobioty po dobu 7 let, kdy byly vzorky odebírány, vyjadřují tabulky 3 a 4. Při prvním rozboru, který byl proveden 3 týdny po porodu nebyly ve stolici detekovány žádné bifidobakterie i přesto, že kojencům byla ihned po narození zařazena probiotika. Na médiích pro bifidobakterii byly detekovány klostridie. U Kojence 1 byly detekovány vysoké počty *E. coli*, u Kojence 2 byly počty *E. coli* nižší. U obou kojenců byly zároveň detekovány vysoké počty laktobacilů. Další rozbor byl proveden po 3 týdnech podávání Biopronu (23.09.2014). V tomto rozboru již byly detekovány bifidobakterie u obou kojenců. Počty laktobacilů u Kojence 1 klesly, zatímco u Kojence 2 došlo k zvýšení jejich počtu. U obou kojenců došlo zároveň k navýšení celkových počtů, u Kojence 2 bylo navýšení větší. U Kojence 2 došlo i k navýšení počtu enterokoků. Klostridie již nebyly detekovány ani v jednom vzorku. Další změny ve vývoji mikrobioty lze sledovat v rozboru z 10.10.2014, dva týdny po vysazení probiotik Biopron, u obou kojenců došlo k nárůstu počtu laktobacilů a koliformních bakterií. U kojence 2 došlo i k navýšení počtu bifidobakterií MUP. Výrazné změny pak byly sledovány až v rozboru z 14.01.2015, kdy u obou kojenců došlo k poklesu všech druhů bakterií. V dalších rozborech došlo opět k nárůstu počtu bakterií, nízké zůstaly pouze počty enterokoků a *E. coli*.

Vývoj počtu klostridií, bifidobakterií, *E. coli* a enterokoků v čase znázorňuje detailněji graf č.3, kde je zároveň vidět porovnání mezi Kojencem 1 a 2.

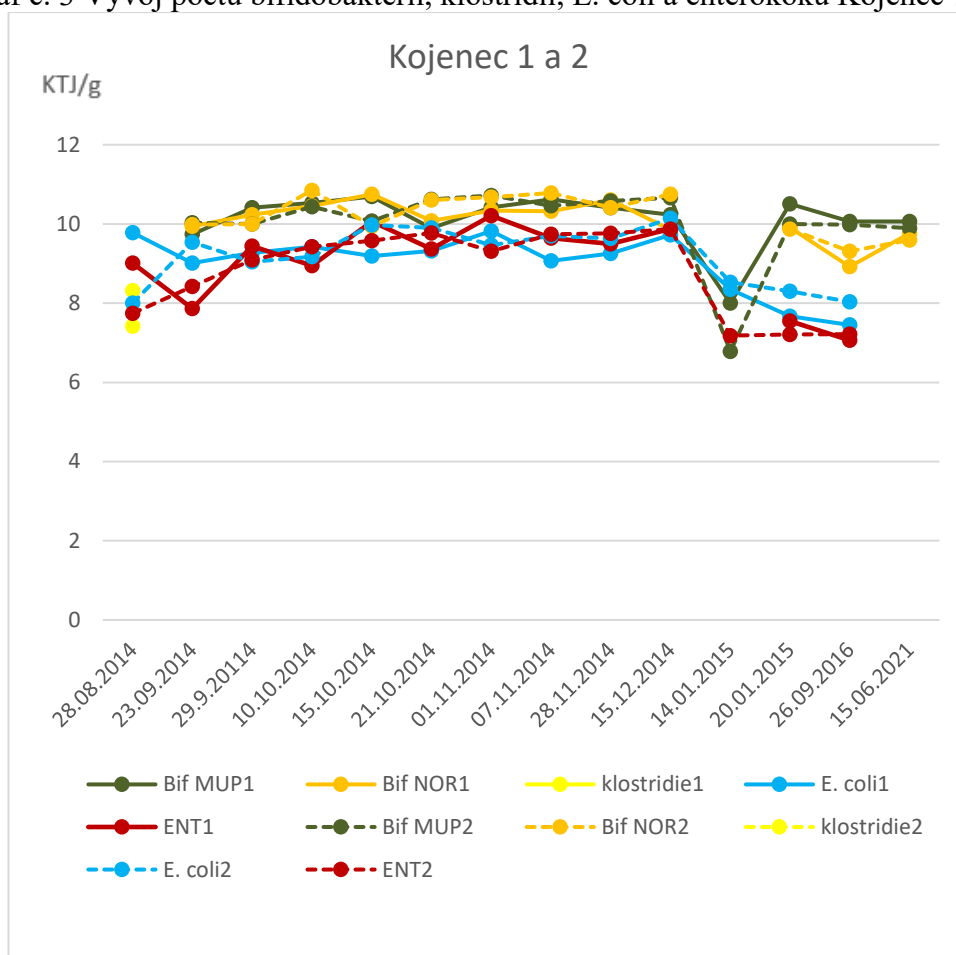
Graf č. 1 Vývoj mikrobioty v čase Kojenec 1



Graf. č. 2 Vývoj mikrobioty v čase Kojenec 2



Graf. č. 3 Vývoj počtu bifidobakterií, klostridií, E. coli a enterokoků Kojenec 1 a 2



5.3 Porovnání počtů bakterií po zařazení probiotik

Statistické vyhodnocení významnosti rozdílu mezi počty bakterií v jednotlivých rozborech bylo provedeno pomocí T testu. Porovnávány byly tyto rozbory: 28.08.2014 × 23.09.2014 (3 týdny po podávání Biopronu), 23.09.2014 × 10.10.2014 (2 týdny po vysazení Biopronu) a 10.10.2014 × 26.09.2016. Zvlášť byly provedeny T testy pro bifidobakterie. Tabulka 9 a 10 ukazuje výsledky T testu pro *E. coli* mezi rozbory z 28.08.2019×26.09.2016.

Tab. č. 3 T test pro všechny bakterie Kojenec 1

T test pro všechny bakterie	28.08.2014	23.09.2014	10.10.2014
	×	×	×
	23.09.2014	10.10.2014	26.09.2016
t Stat	-1,27193201	-0,4696314	0,0207645
t krit (2)	2,119905299	2,1199053	2,16036866

Tab. č. 4 T test pro všechny bakterie Kojenec 2

T test pro všechny bakterie	28.08.2014	23.09.2014	10.10.2014
	×	×	×
	23.09.2014	10.10.2014	26.09.2016
t stat	-1,4903008	-0,378105	-0,2113249
t krit (2)	2,1199053	2,1199053	2,16036866

Tab. č. 5 T test pro bifidobakterie Kojenec 1

T test pro bifidobakterie	28.08.2014	23.09.2014	10.10.2014
	×	×	×
	23.09.2014	10.10.2014	26.09.2016
t stat	-98,4	-6,0350985	1,750082037
t krit (2)	4,30265273	4,30265273	4,30265273

Tab. č. 6 T test pro bifidobakterie Kojenec 2

T test pro bifidobakterie	28.08.2014	23.09.2014	10.10.2014
	×	×	×
	23.09.2014	10.10.2014	26.09.2016
t stat	-400,2	-3,002607	2,51656911
t krit (2)	4,30265273	4,3026527	4,30265273

Tab. č. 7 T test pro *E. coli* Kojenec 1

T test pro <i>E. coli</i>	28.08.2014×26.09.2016
t stat	4,58284791
t krit	4,30265273

Tab. č. 8 T test pro *E.coli* Kojenec 2

T test pro <i>E. coli</i>	28.08.2014×26.09.2016
t stat	0,773909806
t krit	4,30265273

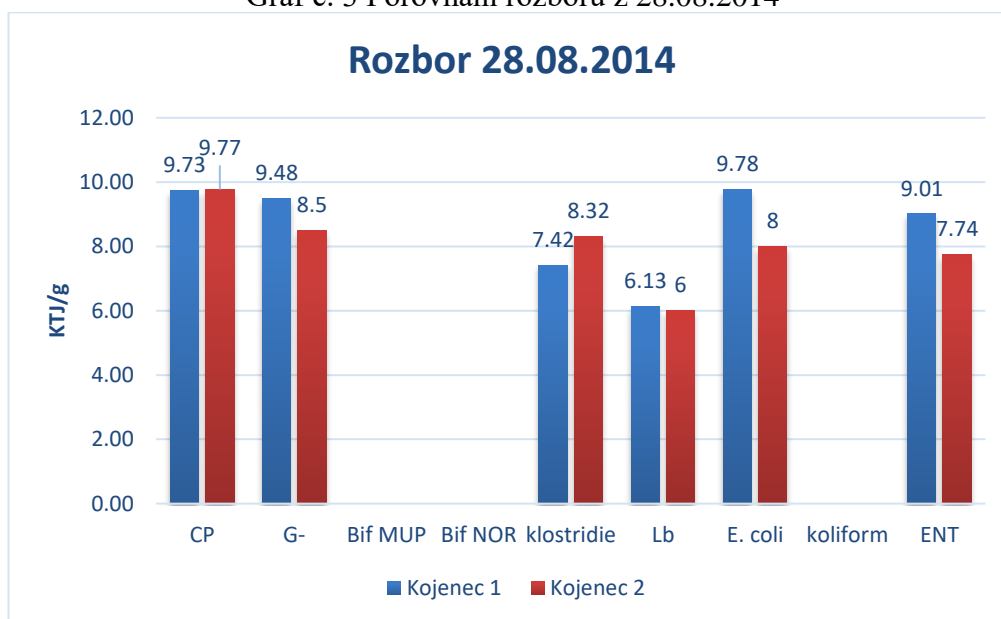
Na základě T testu nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v počtu bakterií v rozborech z 28.08.2014 a 23.09.2014, 23.09.2014 a 10.10.2014, rozdíly nebyly zjištěny ani

mezi rozbory z 10.10.2014 a 26.09.2016, a to u obou kojenců. Na základě hodnoty T stat však můžeme říct, že k větším rozdílům v počtu bakterií docházelo mezi rozbory 28.08.2014 a 23.09.2014, což bylo tři týdny po zavedení probiotik Biopron. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny pouze v počtech bifidobakterií a to v prvním porovnání (28.08.2014×23.09.2014) u obou kojenců, v druhém porovnání (23.09.2014×10.10.2014) byl zjištěn statisticky významný rozdíl pouze u Kojence 1. Ve třetím porovnání nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v počtu bakterií ani u jednoho kojence. Jako poslední byl zjišťován statisticky významný rozdíl v počtu bakterií *E. coli* mezi rozbory z 28.08.2014 a 26.09.2016, dle výsledku můžeme říct, že u Kojence 1 existuje statisticky významný rozdíl v počtu *E. coli* mezi rozbory z 28.08.2014 a 26.09.2016, u Kojence 2 statisticky významný rozdíl není. Všechny testy byly provedeny na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

5.4 Porovnání vývoje mikrobioty mezi kojenci

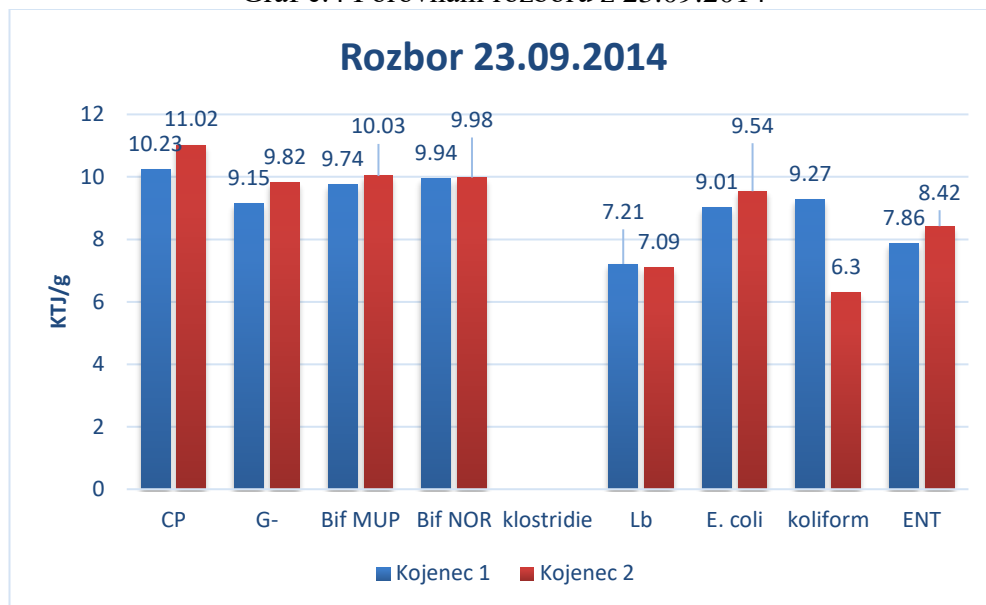
Vliv probiotik na mikrobiotu byl porovnáván i mezi dvojčaty navzájem. Porovnány byly hodnoty z 28.08.2014; 23.09.2014 (3 týdny po podávání Biopronu); 10.10.2014 (2 týdny po vysazení Biopronu) a z 26.09.2016. Hodnoty z jednotlivých rozborů byly na závěr porovány pomocí T testu, porovnány byly i průměrné počty bakterií ze všech rozborů.

Graf č. 3 Porovnání rozboru z 28.08.2014



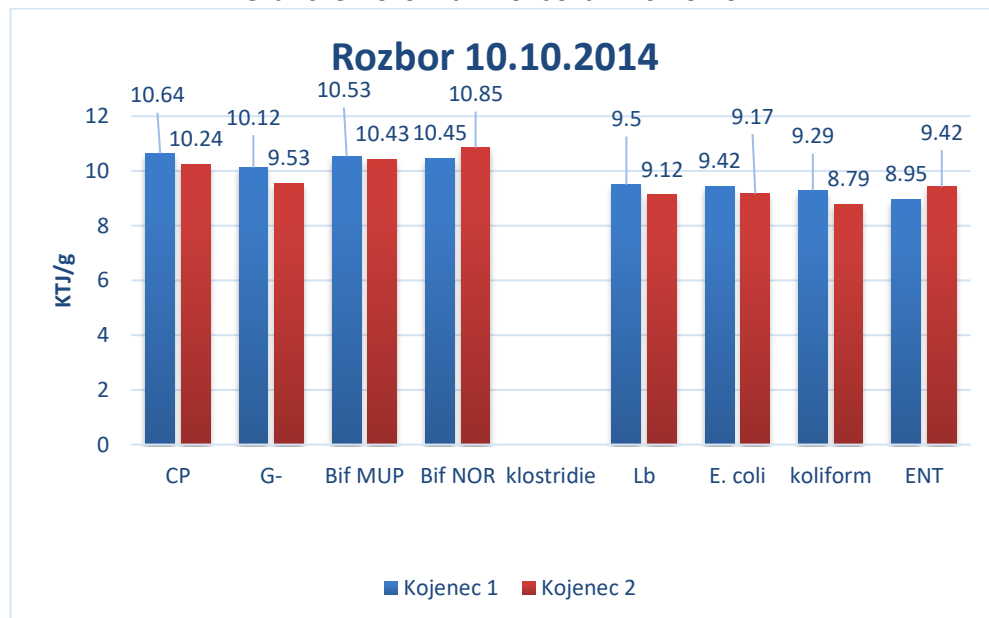
Na prvním rozboru z 28.08.2014 byly detekovány největší rozdíly v počtu *E. coli*. Počet *E. coli* byl u Kojence 1 o 1,78 KTJ/g vyšší, vyšší byly u Kojence 1 i počty enterokoků a to o 1,25 KTJ/g, dále pak byly vyšší počty gramnegativních bakterií o 0,98 KTJ/g. Naopak nižší počty byly zaznamenány hlavně v počtu klostridií a to o 0,90 KTJ/g. Hodnoty CP byly srovnatelné.

Graf č.4 Porovnání rozboru z 23.09.2014



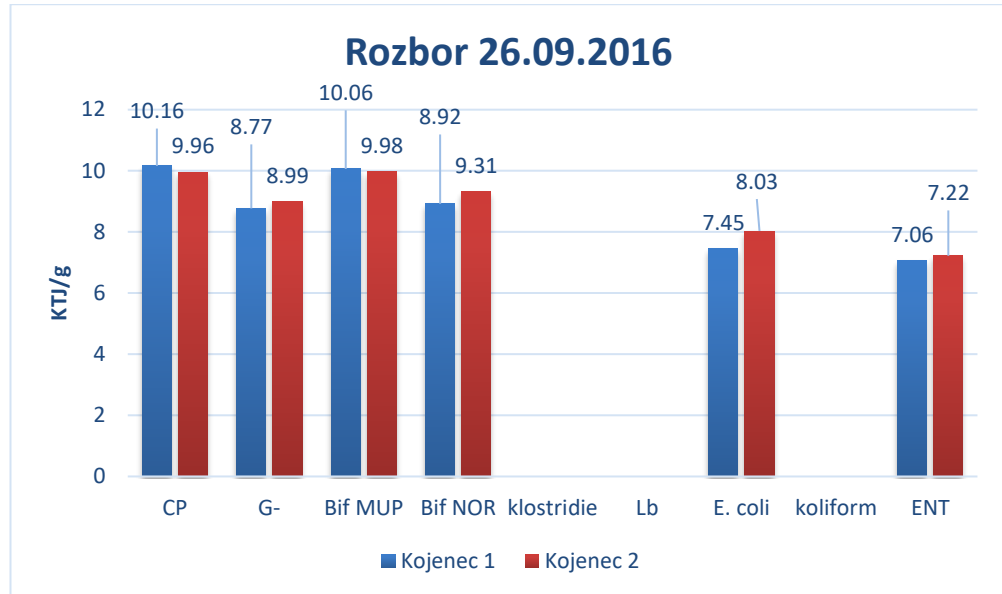
Rozbor z 23.09.2014 byl proveden 3 týdny po podávání probiotik Biopron. V tomto rozboru byl největší rozdíl detekován v počtu koliformních bakterií, který byl u Kojence 1 o 2,03 KTJ/g větší. U Kojence 2 byly detekovány vyšší hodnoty CP (0,21 KTJ/g), gramnegativních bakterií (0,67 KTJ/g), bifidobakterií MUP (0,29 KTJ/g), *E. coli* (0,53 KTJ/g) a enterokoků (0,56 KTJ/g). Počty laktobacilů byly o 0,12 KTJ/g vyšší u Kojence 1.

Graf č. 5 Porovnání rozboru z 10.10.2014



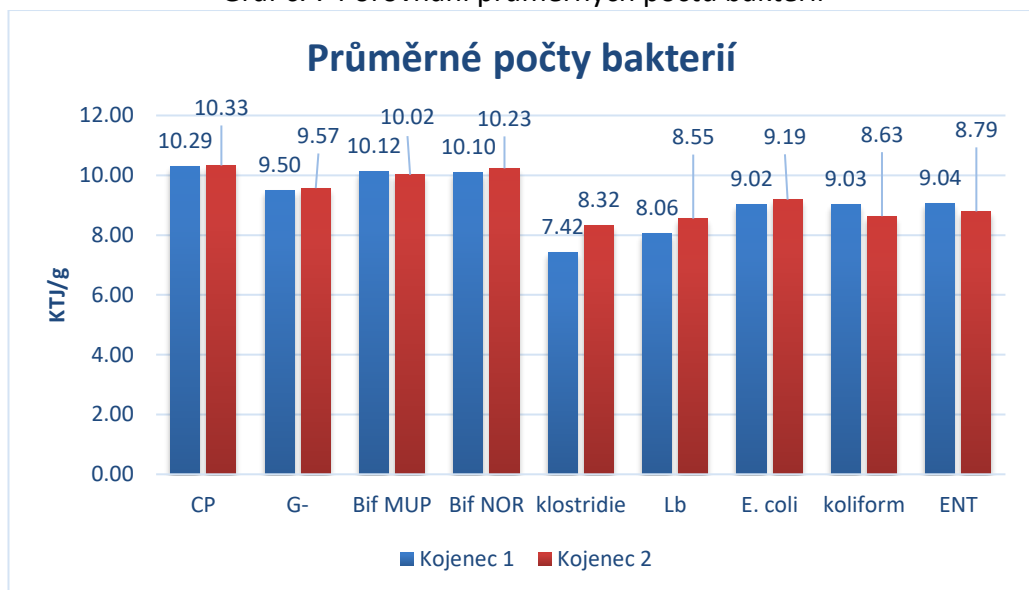
Při rozboru 10.10.2014 (2 týdny po vysazení probiotik Biopron) byly naměřeny u obou kojenců podobné počty bakterií. Největší rozdíl byl v počtech gramnegativních a koliformních bakterií, které byly u Kojence 1 vyšší, ne však o více jak 1KTJ/g. Počty enterokoků byly u Kojence 2 o 0,47 KTJ/g vyšší.

Graf č. 6 Porovnání rozboru z 26.09.2016



V rozboru z 26.09.2016 nebyly detekovány výraznější rozdíly v počtech bakterií. Největší rozdíl byl v počtech *E. coli* a Bif NOR, které byly u Kojence 2 vyšší o 0,58 KTJ/g a o 0,39 KTJ/g.

Graf č. 7 Porovnání průměrných počtů bakterií



Na závěr byly porovnány i průměrné hodnoty všech bakterií, ze všech rozborů, které byly po dobu 7 let prováděny. Největší rozdíl byl v počtu klostridií, který byl u Kojence 2 o 0,9 KTJ/g vyšší. Také počty laktobacilů byly o 0,49 KTJ/g vyšší u Kojence 2. Průměrné počty koliformních bakterií byly o 0,4 KTJ/g vyšší u Kojence 1. Ostatní počty bakterií byly u obou kojenců srovnatelné. Nakonec byly všechny rozborů statisticky vyhodnoceny pomocí T testu. Výsledky T testu (viz Tab. č. 7) neprokázaly statisticky významný rozdíl v počtech bakterií mezi Kojencem 1 a Kojencem 2.

Tab. č. 9 T test porovnání kojenců

T test	28.08.2014	29.09.2014	10.10.2014	26.09.2016	avg
t Stat	0,680846	0,0386305	0,4897503	-0,2580958	-0,2802271
t krit (2)	2,2281389	2,1447867	2,1447867	2,22813885	2,1199053

6 Diskuze

6.1 Střevní mikrobiota po císařském porodu

Naše tělo osidluje obrovská populace mikroorganismů, kterou nazýváme mikrobiota. Ačkoliv se v našem střevě nachází mnoho druhů mikroorganismů, neexistuje jedna optimální kompozice zaručující zdraví jedince. Stav, kdy je narušen poměr mezi žádoucími a nežádoucími druhy mikroorganismů se nazývá dysbióza. Dysbióza je spojována s řadou onemocnění jako je například syndrom dráždivého střeva, kardiovaskulární choroby, vysoká hladina cholesterolu, diabetes, astmata i řada psychických poruch (Salminen et al., 2004).

Klíčovým faktorem ovlivňující vývoj mikrobioty novorozence je způsob porodu. Po přirozeném vaginálním porodu je mikrobiota složena převážně z bifidobakterií (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* aj.), dalšími často se vyskytujícími rody jsou pak *Streptococcus*, *Bacteroidetes* a později i *Lactobacillus* (Biasucci et al. 2010). Po císařského porodu se v mikrobiotě vyskytují hlavně rody *Clostridium* a *Enterococcus*, právě přítomnost rodu *Clostridium* bývá často příčinou různých gastrointestinálních poruch v novorozeneckém věku (Rutayisire et al. 2016). Dle Musilova et al., 2015 se rod *Clostridium* častěji vyskytuje u kojenců s absencí rodu *Bifidobacterium*.

Rozbor, který byl proveden 28.08.2014, výše zmíněná fakta potvrzuje, stolice obou kojenců narozených císařským řezem obsahovala tři týdny po porodu klostridie a nebyly zde detekovány bifidobakterie. Ačkoliv rozbor nebyl zaměřen na detekci klostridií, tak k jejich nárstu došlo na médiích pro bifidobakterie. Tento jev vysvětluje (Pechar et al., 2014) tím, že zvolená média pro kultivaci bifidobakterií nezaručují dostatečnou selektivitu a z toho důvodu, zde může dojít k nárstu klostridií. Jakožto vhodný selektivní faktor uvádí (Novakova et. al., 2014) použití 8 HQ (8-hydroxychinolin) v kombinaci s mupirocinem, kdy po přidání 8 HQ došlo již po 18 hodinách k inhibici růstu *Clostridium difficile*, růst bifidobakterií nebyl tímto faktorem ovlivněn. Nutno však podotknout, že přítomnost klostridií v mikrobiotě novorozence nemusí vést ke gastrointestinálním onemocněním jako je tomu u dospělého, a to z důvodu absence mechanismu, který váže a následně zpracovává toxiny nebo z důvodu přítomnosti ochranných složek mateřského mléka (Hung et al., 2015).

Zarážející v rozboru z 28.08.2014 byly pouze počty laktobacilů (Kojenec 1- $6,13 \pm 0,06$; Kojenec 2- $6,00 \pm 0,00$). Počty laktobacilů u novorozenců narozených císařským řezem bývají v prvních týdnech života nižší např. studie (Musilova et. al., 2015) uvádí průměrný počet laktobacilů u kojenců v průměrném 20 dnu života $3,90 \pm 2,02$. Vyšší hodnota u našich kojenců je pravděpodobně způsobena podáváním probiotik BioGaia, která obsahují konkrétně druh *Lactobacillus reuteri*. Počty laktobacilů zůstávaly vysoké i v dalších rozborech, což mohlo být způsobeno díky tomu, že byli kojenci plně kojeni. Mateřské mléko obsahuje kromě laktobacilů i bifidobakterie a přes 200 druhů OMM, což dělá z mateřského mléka první zdroj prebiotik a probiotik pro novorozence. Mateřské mléko tak zajišťuje správný vývoj mikrobioty, modulaci imunity a účastní se i na rozvoji mozku (Soto et al. 2014; Musilova et. al., 2015).

6.1.1 Modifikace střevní mikrobioty podáváním probiotik

Probiotika definujeme jakožto živé nepatogenní mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství mají pozitivní vliv na zdraví jedince. Jejich funkcí je podpoření střevní funkce a udržení její eubiózy (Nevoral, 2004).

U našich kojenců byla z důvodu absence bifidobakterií v prvním rozboru, ihned zavedena probiotika Biopron, která obsahují druhy *B. breve*, *B. bifidum* a *B. longum*. Další rozbor byl proveden tři týdny po zavedení Biopronu, tedy 23.09.2014. Již v tomto rozboru byl

shledán statisticky významný rozdíl v počtu bifidobakterií u obou kojenců, počty Bif MUP byly u Kojence 1 o 9,74 KTJ/g vyšší, u Kojence 2 o 10,03 KTJ/g vyšší a Bif NOR byly u Kojence 1 o 9,94 KTJ/g vyšší, u Kojence 2 o 9,98 KTJ/g vyšší. Poté byla probiotika kojencům vysazena a po 2 týdnech 10.10.2014 byl proveden další rozbor ve kterém byl shledán statisticky významný rozdíl v počtu bifidobakterií u Kojence 1, kdy i přes absenci Biopronu došlo k nárstu počtu bifidobakterií. U Kojence 2 byly počty bifidobakterií srovnatelné. Počty bifidobakterií zůstaly srovnatelné i v dalších rozbořech. K udržení počtu bifidobakterií mohlo pomoci i zařazení kaši od firmy Nestlé BEBA do diety kojenců. Tyto kaše obsahují *B. animalis* a byly kojencům podávány od 3 měsíců věku.

Rod *Bifidobacterium* je jedním z nejčastějších rodů kolonizující střevo novorozence a vzhledem ke svým pozitivním účinkům na zdraví jedince je tomuto probiotiku věnována stále větší pozornost. U kojenců narozených vaginálně tvoří bifidobakterie až 90% mikrobiální populace, u kojenců narozených císařským řezem je počet bifidobakterií nižší. Vyšší počty bifidobakterií mají pozitivní vliv na zdraví jedince, především snížením výskytu střevních infekcí a průjmů, bariérou proti patogenům či správným vývojem imunitního systému (LoCascio et al, 2010). Z toho důvodu byla probiotika našim kojencům zavedena již od narození.

Dále byly porovnávány počty *E. coli* v prvním rozboru (28.08.2014) a posledním rozboru ve kterém byly detekovány (26.09.2016). U Kojence 1 došlo ke statisticky významnému rozdílu v počtu *E. coli*, u Kojence 2 nikoliv. *E. coli* se běžně vyskytují ve střevě člověka a zahrnují jak patogenní, tak nepatogenní druhy. Jedním z nepatogenních druhů je *E. coli* Nissle 1917, která má probiotické účinky a využívá se při trávicích potížích nebo pokud chceme zabránit šíření patogenních mikroorganismů. Některé nepatogenní druhy *E. coli* se podílí na tvorbě vitamínů, např. *E. coli* KBT001 se podílí na tvorbě vitamínu B12 (Jonkers et al. 2012). Dle studie (Yang et al. 2019) se počty *E. coli* zvyšují při zavedení smíšené stravy. U našich kojenců však byly sledovány vysoké počty *E. coli* již od narození. Kojenci byli pravděpodobně kontaminováni *E. coli* z okolního prostředí (ruce zdravotnického personálu, náčiní atd.) během císařského porodu a pouze u Kojence 1 došlo následně během života k poklesu jejich hodnot, u Kojence 2 zůstaly hodnoty srovnatelné, nutno říci, že jejich počet v prvním rozboru nebyl tak vysoký jako u Kojence 1 (Kojenec 1- 9,78 KTJ/g; Kojenec 2- 8,00 KTJ/g). Ve studii (Musilova et. al., 2015) byly u novorozenců jejichž mikrobiota neobsahovala bifidobakterie také dominantní bakterie *E. coli* a to v počtu 8,56 KTJ/g u vaginálně narozených dětí a v počtu 9,40 KTJ/g u dětí narozených císařskou sekcí, což jsou podobné hodnoty jako byly naměřeny u našich kojenců. Ačkoliv kmeny *E. coli* v našich rozbořech nebyly identifikovány, můžeme říci, že se jednalo o nepatogenní kmeny, protože kojenci netrpěli žádným průjmovým onemocněním.

6.1.2 Vliv užívání probiotik na jednotlivce

Střevní prostředí se u každého jednotlivce výrazně liší. Jeho složení a funkce jsou výrazně ovlivněny stravou, aktivitou, životními podmínkami, medikací, komorbiditou, a proto nemůžeme při podávání probiotických preparátů očekávat u každého jedince stejný efekt a to ani u tak podobných jedinců, jako jsou dvojčata. I jednovaječná dvojčata mohou mít mikrobioty výrazně odlišné (Gao R. et. al., 2019; Jílek, 2020). Ačkoliv u našich kojenců nebyly při jejich porovnání T testem shledány statisticky významné rozdíly v žádném z porovnávaných rozbořů, při podrobnějším pohledu do grafů 3-7 jsou patrné malé odchylky v počtech jednotlivých bakteriálních druhů.

Porovnáním mikrobioty jednovaječných a jednovaječných dvojčat se zabývaly studie (Turnbaugh et al., 2009; Yatsunenko et al., 2012). Jedná se o první studie, ve kterých bylo zkoumáno více jak 50 dvojčat. Obě studie prokázaly, že mikrobioty jednovaječných dvojčat si

jsou více podobné než mikrobioty dvojčat dvouvaječných, i přes to nebyly počty jednotlivých druhů úplně stejné ani u jednovaječných dvojčat.

Nejvýraznější rozdíl mezi našimi kojenci byl pozorován v prvním rozboru, a to hlavně v počtu *E. coli*, enterokoků a klostridií, které bývají častou příčinou klostridiové kolitidy. Studie (La Rosa et. al., 2014) tvrdí, že hlavním faktorem určující množství klostridií ve střevní mikrobiotě není způsob porodu, ale mnohem důležitější je gestační věk a podávání antibiotik. Analýza vzorků odebíraných od předčasně narozených dětí prokázala, že s rostoucím gestačním věkem roste i počet klostridií. V případě podávání antibiotik, bylo zaznamenáno snížení počtu klostridií, k tomuto efektu však docházelo pouze u novorozenců narozených po 28 týdnu gestačního věku. Počet klostridií ovlivňuje i podávání antibiotik matkám jak před porodem, tak i po něm. Podávání antibiotik je spojeno s vyšším výskytem *Clostridium leptum* a nižšími počty bifidobakterií (Rutayisire et al., 2016).

V dalších rozbořech provedených po podávání probiotik Biopron již nebyly klostridie detekovány ani u jednoho kojence a díky podávání těchto probiotik došlo ke kolonizaci bifidobakteriemi. Jak již bylo zmíněno výše, vhodnost podávání daného druhu probiotik je velice sporná. Problémem je interindividuální variabilita jedinců, která způsobuje, že dané probiotikum někomu pomáhá a někomu ne. Možným řešením je druhová analýza složení střevní mikrobioty pomocí sekvenčních metod. Toto vyšetření je bohužel finančně i časově náročné, a tak se v praxi přistupuje k výběru probiotik metodou pokus omyl (Jílek, 2020).

Pozitivní vliv podávání probiotik obsahující bifidobakterie zkoumala i rozsáhlá randomizovaná studie provedená na stovkách dětí, která prokázala celkové snížení mortality, incidence, závažnosti a komplikací léčby dětí s nekrotizující enterokolitidou. Nejčastěji používanými druhy byly *B. breve*, *B. infantis*, *B. bifidum* (Rao et. al., 2007). Jedna studie využila i *B. animalis* jakožto možný způsob léčby dětské koliky. Výsledky prokázaly účinnost *B. animalis* v boji proti tomuto onemocnění, což studie vysvětluje tím, že v boji proti dětské kolice se výrazně zapojuje střevní mikrobiota kojence podporující léčebnou roli probiotik (Nocerino et al., 2020).

V posledním rozboru byly odebrány izoláty bifidobakterií a pomocí přístroje MALDI-TOF identifikovány na úroveň druhu *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium bifidum*. Tyto benefiční bakterie jsou běžnou součástí mikrobioty dětí i dospělých. Bifidobakterie se ve střevě účastní mnoha metabolických a fyziologických pochodů. Konkrétně *B. adolescentis* je považován za producenta GABA (kyselina gama amino máselná), což je hlavní inhibiční mediátor v centrálním nervovém systému. Díky tomu, je tato bakterie schopna ovlivnit výskyt mentálních poruch jako jsou deprese či úzkosti. Tento fakt byl potvrzen studií (Duranti et. al., 2020), která při podávání *B. adolescentis* PRL2019 a *B. adolescentis* HD17T2H myším, detekovala vyšší tvorbu GABA v myším organismu.

7 Závěr

Při pohledu na výsledky všech rozborů jsou viditelné rozdíly v počtu jednotlivých druhů bakterií u obou kojenců. Změny jsou viditelné hlavně v prvních měsících života, kdy z důvodu císařského porodu a následné modifikace mikrobioty probiotiky doházelo ke změnám v počtech bakterií, a to hlavně klostridií, bifidobakterií a *E. coli*.

Rozdíl mezi zkoumanou mikrobiotou v jednotlivých rozborech byl prokázán pouze v počtu bifidobakterií mezi rozbory z 28.08.2014 a 23.09.2014 (3 týdny po zavedení Biopronu) u obou kojenců a u Kojence 1 i mezi rozbory z 23.09.2014 a 10.10.2014 (2 týdny po vysazení Biopronu). U Kojence 1 byl prokázán rozdíl i v počtu *E. coli* mezi rozbory z 28.08.2014 a 26.09.2014. Tyto výsledky byly získány pomocí T testu, na hladině významnosti $\alpha=0,05$.

Mezi kojenci nebyly prokázány statisticky významné rozdíly v počtech bakterií ani v jednom rozboru ale při pohledu do grafů 3-7 jsou malé rozdíly viditelné, což potvrzuje tvrzení o variabilitě mikrobioty každého z nás, která způsobuje rozdílný účinek při podávání probiotik.

Výsledky analýzy MALDI-TOF potvrdily výskyt bifidobakterií běžně se vyskytujících v mikrobiotě dětí i dospělých jedinců.

Ze získaných výsledků můžeme potvrdit, že způsob porodu doopravdy ovlivňuje složení střevní mikrobioty kojence, především v prvních měsících života. Zároveň můžeme potvrdit účinnost probiotik, při snaze o modifikaci mikrobioty ve prospěch jedince.

8 Literatura

1. ANDREAS, Nicholas a Beate KAMPMANN, 2015. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* . [online]. **11**(91), 629-35 [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013.
2. ARDISONE, Alexandria, Diomel CRUZ a Austin DAVIS-RICHARDSON, 2014. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One* [online]. **3**(9) [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0090784
3. BELIZÁRIO, José a Mauro NAPOLITANO, 2015. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol* [online]. **6** [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26500616/>
4. BIASUCCI, Giacomo a Monica RUBINI, 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev* . [online]. (86), 13-15 [cit. 2022-01-26]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2010.01.004>
5. BIASUCCI, Giacomo, Monica RUBINI, Sara RIBONI, Lorenzo MORELLI a Elena BESSI, 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev* . [online]. **18**(1), 13-15 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20133091/>
6. BODE, Lars, 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Human Development* [online]. **11**(91), 619-22 [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.09.001>
7. BRAHM, Paulina a Veronica VALDES, 2017. Benefits of breastfeeding and risks associated with not breastfeeding. *Rev Chil Pediatr* . [online]. **88**(1), 7-14 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28288222/>
8. BRUMBAURG, David, Jaime ARRUDA a Kristen ROBINS, 2016. Mode of Delivery Determines Neonatal Pharyngeal Bacterial Composition and Early Intestinal Colonization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* . [online]. **3**(63), 320-28 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27035381/>
9. DE GOFFAU, Marcus a Susane LAGER, 2019. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature* [online]. 329-34 [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1451-5>
10. DOMINGUEZ-BELLO, Maria, Elizabeth COSTELLO a Monica CONTRERAS. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* . [online]. 2009, **26**(107), 11971-11975 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1002601107
11. DOMINIGUEZ, Maria a Elizabeth COSTELLO, 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A* . [online]. **107**(26), 11971–11975 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:<https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.1002601107>
12. DURANTI, Sabrina, Gabriele LUGLI, Christian MILANI a Francesca TURONNI, 2017. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* . [online]. **3**(83), 894-16 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27864179/>
13. DURANTI, Sabrina, Lorena RUIZ, Gabriele LUGLI a Hector TAMES, 2020. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the

- production of GABA* [online]. **10**(2) [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70986-z>
14. FAGARASSAN, Sidonia, Shimpei KAWAMATO a Osami KANAGAWA, 2010. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu Rev Immunology* [online]. **28**, 243-73 [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101314>
 15. FILIPO, Carlotta, Duccio KAVALIERY a , 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* [online]. **33**(107) [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.1005963107](https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107).
 16. GAO, W, W CAO a S WANG. The Chinese National Twin Registry: a 'gold mine' for scientific research. *Journal of internal medicine* [online]. **3**(286), 299-308 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/joim.12926>
 17. GARCIA, Ortega a Carizo GALLARDO, 2006. Meconium and neurotoxicants: searching for a prenatal exposure timing. *Arch Dis Child*. [online]. **8**(91), 642-46 [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: doi:<https://dx.doi.org/10.1136%2Fadc.2005.084129>
 18. HARDER, Thomas, Renate BERGMANN a Berg KALISCHNIG, 2005. Duration of breastfeeding and risk of overweight: a meta-analysis. *Am J Epidemiol* [online]. **5**(162), 397-403 [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: doi:[10.1093/aje/kwi222](https://doi.org/10.1093/aje/kwi222).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1002601107>
 19. HU, Jianzhing, Yokko NOMURA a Ali BASHIR, 2013. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *Plos one* [online]. **8**(11) [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24223144/>
 20. HUNG, Yuan a Jen LEE, 2015. Clinical impact of Clostridium difficile colonization. *J Microbiol Immunol Infect* [online]. **3**(48), 241-8 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.jmii.2014.04.011](https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.011).
 21. HYUN, Kim a Kyungdo HAN, 2018. Effects of Antibiotics on the Development of Asthma and Other Allergic Diseases in Children and Adolescents. *Allergy Asthma Immunol Res* [online]. **10**(5), 457-65 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:[10.4168/aair.2018.10.5.457](https://doi.org/10.4168/aair.2018.10.5.457).
 22. CHEN, Jing, Tamal RINGEL- KULKA a Yehuda RINGEL, 2016. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME J* [online]. **4**(10), 1002-14 [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26430856/>
 23. CHU, Derrick, Jun MA a Amanda PRINCE, 2017. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. *Nat Med* . [online]. **3**(23), 314-26 [cit. 2022-01-26]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/nm.4272>
 24. CHUA, Mei a Kaouther BEN-AMOR, 2017. Effect of Synbiotic on the Gut Microbiota of Cesarean Delivered Infants: A Randomized, Double-blind, Multicenter Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* . [online]. **65**(1), 102-106 [cit. 2022-03-28]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28644357/>
 25. JANÁKOVÁ, A. a J. BOŽENSKÝ, 2019. Probiotika pro prvních 1000 dnů života.77. kongres pro lékárníky a farmaceutické asistenty. Plzeň.
 26. JÍLEK, Petr, Daniel LEŠKO a Jan KESTŘÁNEK, 2020. Probiotika v gynekologii. *Prakt. Lékáren*. [online]. **16**(1), 12-16 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:[10.36290/lek.2020.002](https://doi.org/10.36290/lek.2020.002)

27. JONKERS, Wilfried, Yanhong DONG a Karen BROZ. *The Wor1-like Protein Fgp1 Regulates Pathogenicity, Toxin Synthesis and Reproduction in the Phytopathogenic Fungus Fusarium graminearum* [online]. **8**(5) [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002724>
28. KONIG, Jeremy a Ayme SPOR, 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* . [online]. **15**(108), 4578-85 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.1000081107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107)
29. LA ROSA, Patricio, Barbara WARNER a Erica SODERGREN, 2014. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* . [online]. **34**(111) [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:[10.1073/pnas.1409497111](https://doi.org/10.1073/pnas.1409497111)
30. LAURSEN, Martin, Louise ANDERSEN a Kim MICHAELSEN, 2016. Infant Gut Microbiota Development Is Driven by Transition to Family Foods Independent of Maternal Obesity. *MSphere* . [online]. **1**(10) [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:[10.1128/mSphere.00069-15](https://doi.org/10.1128/mSphere.00069-15).
31. LAURSEN, Martin, Martin BAHL a Kim MICHAELSEN, 2017. *First Foods and Gut Microbes* [online]. **6**(8) [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:[10.3389/fmicb.2017.00356](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00356).
32. LAZAR, Veronika, Lia DITU a Irina GHEORKE, 2018. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Immunol* [online]. **9**(15) [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01830>
33. LOCASCIO, Ricardo a Prerak DESAI, 2010. Broad Conservation of Milk Utilization Genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as Revealed by Comparative Genomic Hybridization. *Appl Environ Microbiol*. [online]. **22**(76), 7373–7381 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:[10.1128/AEM.00675-10](https://doi.org/10.1128/AEM.00675-10)
34. MA, Jingran, Zhenghong LI a Wenjuang ZHANG, 2020. Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. *Sci Rep*. [online]. **10** [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:[10.1038/s41598-020-72635-x](https://doi.org/10.1038/s41598-020-72635-x)
35. MARKOWIAK, Paulina a Katarzyna SLIZEWSKA, 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [online]. **9**(9) [cit. 2022-03-26]. Dostupné z: doi:<https://dx.doi.org/10.3390%2Fn9091021>
36. MAZMANIAN, Sarkis, June ROUND a Denis KASPER, 2008. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* [online]. (453), 620-25 [cit. 2022-01-18]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/nature07008>
37. METSALA, Johana, Anamari LUNDGVIST a Lauri VIRTÁ, 2013. Mother's and offspring's use of antibiotics and infant allergy to cow's milk. *Epidemiology* . [online]. **2**(24), 303-9 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:[10.1097/EDE.0b013e31827f520f](https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e31827f520f).
38. MUSILOVÁ, Šárka, Vojtěch RADA, Eva VLKOVÁ, Věra BUNEŠOVÁ a Jiří NEVORAL, 2015. Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica* [online]. **104**(4), 184-186 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601553/>
39. NEVORAL, Jiří, 2004. *Výživa v dětském věku*. 1. Praha: H+H. ISBN 80-86022-93-5.
40. NOCERINO, Rita, Francesca FILIPIS a Gaetano CECERE, 2020. The therapeutic efficacy of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 ® in infant colic: A randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* . [online]. **51**(1), 110-20 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:[10.1111/apt.15561](https://doi.org/10.1111/apt.15561).

41. PENDERS, John, Carel THIJS, Cornelis VINK a Bianca SNIJDERS, 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* [online]. **2**(18), 511-21 [cit. 2022-01-28]. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2005-2824
42. RADA, Vojtěch a Šárka ROČKOVÁ, 2011. Mateřské mléko – naše první potravina. *Potravinářská revue*. **4**, 12-14.
43. RAO, Shripada, Girish DESHPANDE a Sanjay PATOLE, 2007. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* . [online]. **369**(9573), 1614-20 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(07)60748-X.
44. ROY, P a C AUBERT-JACQUIN, 2004. [Benefits of a thickened infant formula with lactase activity in the management of benign digestive disorders in newborns]. *Arch Pediatr* . [online]. **11**(12) [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:1546-54. doi: 10.1016/j.arcped.2004.10.001.
45. RUTAYISIRE, Erigene, Kun HUANG a Yehao LIU, 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol*. [online]. **16**(1), 16-86 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:10.1186/s12876-016-0498-0
46. SALMINEM, S a G GIBSON, 2004. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* [online]. **9**(53), 1388-9 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:10.1136/gut.2004.041640.
47. SELA, D.A a J CHAPMAN, 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *PNAS* [online]. **48**(105), 18964-18969 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0809584105>
48. SEON-KYUN, Kim, Robin GUEVARRA a You-Tae KIM, 2019. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol* . [online]. **9**(29), 1335-40 [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.1906.06064.
49. SCHELLACK, N a Y COMBRINCK, 2020. Overview of prebiotics, probiotics and synbiotics. *SAGP* [online]. **1**(1), 22-28 [cit. 2022-03-26]. ISSN ISSN 2706-9613. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.36303/SAGP.2020.1.0009>
50. SCHLEY, P.D a C.J FIELD, 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics. *Br J Nutr* . [online]. **87**(2), 1-30 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12088522/>
51. SOTO, Anna a Virgínia MARTIN, 2014. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* . [online]. **59**(1), 78-88 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:10.1097/MPG.0000000000000347.
52. THAVAGNANAM, S a J FLEMING, 2008. A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* . [online]. **38**(4) [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18352976/>
53. THIBAUT, H, C AUBERT-JACQUIN a O GOULET, 2004. Effects of long-term consumption of a fermented infant formula (with *Bifidobacterium breve* c50 and *Streptococcus thermophilus* 065) on acute diarrhea in healthy infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* . [online]. **39**(2), 147-52 [cit. 2022-04-08]. Dostupné z: doi:10.1097/00005176-200408000-00004.

54. TOPPING, D.L a P.M CLIFTON, 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* . [online]. **3**(81), 1031-64 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.2001.81.3.1031
55. TURNBAUGH, Peter, Micah HAMADY a Tanya YATSUNENKO, 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* . [online]. 480-4 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:10.1038/nature07540.
56. VERKHNYATSKAYA, Stella, Michela FERRARI a Paul DE VOS, 2019. Shaping the Infant Microbiome With Non-digestible Carbohydrates. *Front Microbiol* . [online]. **10** [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00343
57. WALKER, Allan, 2017. The importance of appropriate initial bacterial colonization of the intestine in newborn, child, and adult health. *Pediatr Res* [online]. **3**(82), 387-395 [cit. 2021-12-01]. Dostupné z: doi:10.1038/pr.2017.111
58. WILLIAMS, Nancy, 2010. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* [online]. **6**(67), 449–458 [cit. 2021-11-30]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajhp/article-abstract/67/6/449/5130018>
59. YANG, Dongming, Deming ZHAO a Wei WU, 2019. The Role of the Gut Microbiota in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Front Neurol* [online]. **6**(10) [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:10.3389/fneur.2019.01155
60. YASSOUR, Moran, Eeva JASON a Larson HOGSTROM, 2018. Strain-Level Analysis of Mother-to-Child Bacterial Transmission during the First Few Months of Life. *Cell Host Microbe* . [online]. **24**(1), 146-54 [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30001517/>
61. YATSUNENKO, Tanya, Federico REY a Mark MANARY, 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* . [online]. **486**(7402), 222-7 [cit. 2022-04-09]. Dostupné z: doi:10.1038/nature11053.
62. ZHONG, H, J PENDERS, Z FANG, H DING a C THIJS, 2019. Impact of early events and lifestyle on the gut microbiota and metabolic phenotypes in young school-age children. *Microbiome* [online]. **7**(1) [cit. 2022-03-27]. Dostupné z: <https://europepmc.org/article/pmc/pmc6320620>
63. ZINKOVIC, Angela a Zac LEWIS, 2013. Establishment of a Milk-Oriented-Microbiota (MOM) in early life: How Babies Meet Their MOMs. *Food Reviews International* [online]. **5**(1), 1-13 [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:10.2310/6180.2009.00035
64. ZWITTINK, Romy, Ingrid RENES a Richard LINGEN, 2018. Association between duration of intravenous antibiotic administration and early-life microbiota development in late-preterm infants. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. **10**(37) [cit. 2022-01-29]. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-018-3193-y

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

atd- a tak dále
tzv- takzvaný
et. al- a další
obr- obrázek
č- číslo
kg- kilogram
ml- mililitr
mg- miligram
l- litr
μl- mikrolitr
MO- mikroorganismy
RNA- ribonukleová kyselina
DNA- deoxyribonukleová kyselina
WHO- World Health Organization
ATB- antibiotika
ND- nedetekováno
MUP- mupirocin
NOR- norfloxacin
PCR- polymerase chain reaction
TLRS- toll like receptor
KTJ- kolonie tvořící jednotku
GIT- gastrointestinální trakt
EFSA- European Food Safety Authority
OMM- oligosacharidy mateřského mléka
MRSA- meticilin resistantí *Staphylococcus aureus*
FDA- Food and Drug Association
QPS- Qualified Presumption of Safety
TBX- trypton bíle X-glucuronid
TJ- tight junction
WCHB- Wilkins- Chalgren bujón
GRAS- Generally Recognized As Safe
IgA- imunoglobulin A
GOS- galaktooligosacharidy
FOS- fruktooligosacharydy
GABA- kyselina gama-aminomáselná
např- například

10 Samostatné přílohy

Příloha č. 1 Výsledky MALDI-TOF

Název vzorku	ID vzorku	Nápis na vzorku	Organismus (nejlepší shoda)	Skóre hodnota	Organismus (druhá nejlepší shoda)	Skóre hodnota2
B1	1	J1	Bifidobacterium longum	1,87	Bifidobacterium longum	1,85
B2	1	J1	Bifidobacterium longum	1,93	Bifidobacterium longum	1,84
B3	2	J2	Bifidobacterium adolescentis	2,04	Bifidobacterium adolescentis	1,97
B4	2	J2	Bifidobacterium adolescentis	1,90	Bifidobacterium longum	1,84
B5	3	J3	Bifidobacterium adolescentis	2,00	Bifidobacterium adolescentis	1,92
B6	3	J3	Bifidobacterium adolescentis	2,14	Bifidobacterium adolescentis	2,08
B7	4	J4	Bifidobacterium adolescentis	2,13	Bifidobacterium adolescentis	1,84
B8	4	J4	Bifidobacterium adolescentis	2,19	Bifidobacterium adolescentis	2,01
B9	5	J5	Bifidobacterium adolescentis	2,05	Bifidobacterium adolescentis	2,01
B10	5	J5	Bifidobacterium adolescentis	2,10	Bifidobacterium adolescentis	2,06
B11	6	J6	Bifidobacterium adolescentis	2,01	Bifidobacterium adolescentis	1,94
B12	6	J6	Bifidobacterium adolescentis	2,13	Bifidobacterium adolescentis	1,93
B13	7	J7	Bifidobacterium adolescentis	1,75	Bifidobacterium adolescentis	1,73
B14	7	J7	Bifidobacterium adolescentis	2,04	Bifidobacterium adolescentis	1,91
B15	8	J8	Bifidobacterium adolescentis	2,12	Bifidobacterium adolescentis	2,06
B16	8	J8	Bifidobacterium adolescentis	2,18	Bifidobacterium adolescentis	1,99
B17	9	J9	Bifidobacterium adolescentis	1,88	Bifidobacterium adolescentis	1,82
B18	9	J9	Bifidobacterium adolescentis	1,98	Bifidobacterium adolescentis	1,89
B19	10	J10	Bifidobacterium adolescentis	2,10	Bifidobacterium adolescentis	2,08
B20	10	J10	Bifidobacterium adolescentis	2,09	Bifidobacterium adolescentis	2,07
B21	11	J1Č	Bifidobacterium adolescentis	1,79	identifikaci organismu nelze provést	1,66
B22	11	J1Č	Bifidobacterium adolescentis	1,83	Bifidobacterium adolescentis	1,75
B23	12	J2Č	Bifidobacterium bifidum	1,99	Bifidobacterium bifidum	1,85
B24	12	J2Č	žádné piky nenalezeny	0,00	žádné piky nenalezeny	0,00
C1	13	J3Č	Bifidobacterium longum	1,70	identifikaci organismu nelze provést	1,63
C2	13	J3Č	Bifidobacterium longum	2,12	Bifidobacterium longum	1,94
D6	27	J7x	Bifidobacterium longum	1,80	identifikaci organismu nelze provést	1,60
D7	28	J8x	Bifidobacterium adolescentis	1,98	Bifidobacterium adolescentis	1,74
D8	28	J8x	Bifidobacterium adolescentis	1,96	Bifidobacterium adolescentis	1,88
D9	29	J10x	Bifidobacterium longum	1,83	Bifidobacterium adolescentis	1,83
D10	29	J10x	Bifidobacterium adolescentis	1,86	Bifidobacterium adolescentis	1,86
D11	30	V1	Bifidobacterium longum	1,96	Bifidobacterium longum	1,90
D12	30	V1	Bifidobacterium longum	2,03	Bifidobacterium longum	1,84
D13	31	V2	Bifidobacterium longum	1,78	Bifidobacterium longum	1,76
D14	31	V2	Bifidobacterium longum	1,90	Bifidobacterium longum	1,84
D15	32	V3	Bifidobacterium bifidum	2,03	Bifidobacterium bifidum	1,76
D16	32	V3	Bifidobacterium bifidum	1,93	Bifidobacterium bifidum	1,88
D17	33	V4	Bifidobacterium adolescentis	2,18	Bifidobacterium adolescentis	2,15
D18	33	V4	Bifidobacterium adolescentis	2,06	Bifidobacterium adolescentis	1,90
D19	34	V5	Bifidobacterium adolescentis	2,22	Bifidobacterium adolescentis	2,20
D20	34	V5	Bifidobacterium adolescentis	2,18	Bifidobacterium adolescentis	2,08
D21	35	V6	Bifidobacterium adolescentis	2,04	Bifidobacterium adolescentis	1,90
D22	35	V6	Bifidobacterium adolescentis	2,08	Bifidobacterium adolescentis	1,96
D23	36	V7	Bifidobacterium adolescentis	2,20	Bifidobacterium adolescentis	2,04
D24	36	V7	Bifidobacterium adolescentis	2,17	Bifidobacterium adolescentis	2,07
E1	37	V8	Bifidobacterium adolescentis	2,27	Bifidobacterium adolescentis	2,15
E2	37	V8	Bifidobacterium adolescentis	2,20	Bifidobacterium adolescentis	2,11
E3	38	V9x	Bifidobacterium longum	1,87	Bifidobacterium longum	1,82
E4	38	V9x	Bifidobacterium longum	2,03	Bifidobacterium longum	1,87
E5	39	V10x	Bifidobacterium adolescentis	2,10	Bifidobacterium adolescentis	1,99
E6	39	V10x	Bifidobacterium adolescentis	2,05	Bifidobacterium adolescentis	1,94
C3	14	J4Č	Bifidobacterium longum	1,83	Bifidobacterium longum	1,82
C4	14	J4Č	Bifidobacterium longum	1,85	Bifidobacterium longum	1,79
C5	15	J5Č	Bifidobacterium adolescentis	1,98	Bifidobacterium adolescentis	1,83
C6	15	J5Č	Bifidobacterium adolescentis	2,10	Bifidobacterium adolescentis	1,88
C7	16	J6Č	Bifidobacterium longum	1,72	Bifidobacterium longum	1,70
C8	16	J6Č	identifikaci organismu nelze provést	1,56	identifikaci organismu nelze provést	1,53
C9	17	J7Č	Bifidobacterium adolescentis	1,81	identifikaci organismu nelze provést	1,49
C10	17	J7Č	Bifidobacterium adolescentis	1,94	Bifidobacterium adolescentis	1,92
C11	18	J8Č	Bifidobacterium longum	1,86	Bifidobacterium longum	1,70
C12	18	J8Č	Bifidobacterium longum	2,07	Bifidobacterium adolescentis	2,02
C13	19	J9Č	Bifidobacterium adolescentis	1,94	Bifidobacterium adolescentis	1,78
C14	19	J9Č	Bifidobacterium adolescentis	2,12	Bifidobacterium adolescentis	2,11
C15	20	J10Č	Bifidobacterium longum	1,82	Bifidobacterium adolescentis	1,80
C16	20	J10Č	Bifidobacterium adolescentis	2,02	Bifidobacterium longum	1,90
C17	21	J1x	identifikaci organismu nelze provést	1,48	identifikaci organismu nelze provést	1,40
C18	21	J1x	identifikaci organismu nelze provést	1,37	identifikaci organismu nelze provést	1,34
C19	22	J2x	Bifidobacterium longum	1,88	Bifidobacterium longum	1,88
C20	22	J2x	Bifidobacterium longum	1,88	Bifidobacterium longum	1,84
C21	23	J3x	Bifidobacterium longum	2,06	Bifidobacterium longum	1,90
C22	23	J3x	Bifidobacterium longum	1,93	identifikaci organismu nelze provést	1,61
C23	24	J4x	identifikaci organismu nelze provést	1,54	identifikaci organismu nelze provést	1,53
C24	24	J4x	identifikaci organismu nelze provést	1,60	identifikaci organismu nelze provést	1,60
D1	25	J5x	identifikaci organismu nelze provést	1,68	identifikaci organismu nelze provést	1,63
D2	25	J5x	Bifidobacterium longum	2,10	Bifidobacterium longum	1,93
D3	26	J6x	Bifidobacterium longum	2,08	Bifidobacterium longum	2,07
D4	26	J6x	Bifidobacterium longum	1,94	Bifidobacterium longum	1,75
D5	27	J7x	identifikaci organismu nelze provést	1,44	identifikaci organismu nelze provést	1,35

