



SBORNÍK PŘEDNÁŠEK

18. SYMPOZIA

Společnosti pro probiotika a prebiotika

Aula České zemědělské univerzity v Praze

Praha 6 – Suchdol

16. 4. 2024



Česká
zemědělská
univerzita
v Praze

Název: Sborník přednášek 18. Symposia Společnosti pro probiotika a prebiotika

Editoři: doc. Ing. Šárka Musilová, Ph.D. a prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Vydavatel: ČZU v Praze

Počet stran: 32

Rok vydání: 2024

Vydání: první

Počet výtisků: 200

Tisk: Sprinter-Studio s.r.o.

ISBN 978-80-213-3373-4

Za obsahovou a jazykovou úpravu příspěvků odpovídají autoři.

SYMPOZIUM JE PODPOROVÁNO ČLENY PORADNÍ KOMISE SPOLEČNOSTI PRO PROBIOTIKA
A PREBIOTIKA:



Nestlé





PROGRAM

18. SYMPOZIA SPOLEČNOSTI PRO PROBIOTIKA A PREBIOTIKA

16. 4. 2024

Aula České zemědělské univerzity v Praze

8:00 – 9:00 Registrace

9:00 – 9:05 Zahájení

1. Sekce, předsedá: Věra Neužil Bunešová

9:05 – 9:45

Let's not forget the ocean – novel prebiotics for intestinal microbes

Clarissa Schwab

Department of Biological and Chemical Engineering at Aarhus University, Denmark

9:45 – 10:25

Podávání bakterie *Lactiplantibacillus plantarum*^{WJL} podporuje růst chronicky podvyživených mladých myší

Martin Schwarzer

Mikrobiologický ústav AV ČR, Laboratoř gnotobiologie, Nový Hrádek

10:25 – 10:40

Cena Danone pro mladého vědce za nejlepší publikaci 2023

Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* supplementation on the single-cell fecal parasitome in children with celiac disease autoimmunity: a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial

Jakub Hurych

Ústav lékařské mikrobiologie a Pediatrická klinika, 2.LF UK a FN Motol, Praha

10:40 – 10:55

Fekální mikrobiální terapie v léčbě syndromu dráždivého tračníku – pro a proti aneb Co nového přinesla klinická studie MISCEAT?

Jiří Vejmelka

Interní klinika 3. LF UK a FTN, Praha

Přestávka 10:55 – 11:25

2. Sekce, předseda: Jiří Hrdý

11:25 – 11:40

Momentální stav posuzování probiotik a prebiotik v EU

Roman Švejstl

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze; Oddělení chemické bezpečnosti, Centrum Hygieny práce a pracovního lékařství, SZÚ, Praha

11:40 – 11:55

Stanovení přítomnosti probiotických bakterií v doplňcích stravy pomocí multiplexní MOL-PCR

Martin Klanica

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Veterinární univerzita Brno

11:55 – 12:10

Vliv způsobu přípravy ředících médií na kultivační počty bakterií v probiotických doplňcích stravy

Eva Vlková

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze

12:10 – 12:25

LC-MS analýza krátkořetězcových mastných kyselin ve vzorcích myší stolice s využitím derivatizace

Anna Jelínková

Mikrobiologický ústav AV ČR, Laboratoř gnotobiologie, Nový Hrádek

Oběd 12:25 – 13:00

Posterová sekce 13:00 – 13:30

Probiotický kmeň *Enterococcus faecium* CCM 8558 a jeho vplyv na črevnú mikrobiotu v chove farmových pštrosov

Anna Kandričáková

Centrum biovied SAV, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

Autochtónne postbioticky aktívne kmene *Lactococcus lactis*, ich stabilita a prežívanie v jogurtoch z kozieho mlieka

Andrea Lauková

Centrum biovied SAV, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

Využitie enterocínov pre inhibíciu metecilín-rezistentných stafylokokov u voľne žijúcej zveri

Natálie Zábolyová

Centrum biovied SAV, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

Vplyv *Limosilactobacillus fermentum* 2i3 a 0,6 % prídavku humínových látok na vybrané imunitné a produkčné parametre u brojlerov

Erik Hudec

Katedra morfológických disciplín, UVLF Košice

Vplyv *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 na vybrané parametre v jejune brojlerových kurčiat

Viera Karaffová

Katedra morfológických disciplín, UVLF Košice

Imunitná odpoveď pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) po suplementácii novovyvinutým probiotickým prípravkom a následnej infekcii patogénom *Aeromonas salmonicida*

Natália Chomová

Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice,

3. Sekce, předseda: Eva Vlková

13:30 – 13:45

Příprava extracelulárních vezikul izolovaných z kmene *Escherichia coli* O83:K24:H31 pro testování probiotického efektu v myším modelu indukované respirační alergie

Viktor Černý

Ústav imunologie a mikrobiologie UK 1. LF a VFN v Praze

13:45 – 14:00

Vplyv humínových látok a *Limosilactobacillus fermentum* 2I3 na fagocytárnu aktivitu a rastové parametre svalstva u brojlerových kurčiat

Zuzana Kiššová

Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

14:00 – 14:15

Autochtónne probiotiká vo výžive pstruha dúhového a imunologický dopad času ich aplikácie

Marek Ratvaj

Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

14:15 – 14:30

Postbiotický potenciál prospešných kmeňov *Enterococcus faecium* CCM8558, CCM7419 a CCM7420, nový prístup pre zachovanie kvality králičieho mäsa

Monika Pogány Simonová

Centrum biovied SAV, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

14:30 – 14:45

***Enterococcus faecium* EF 412 s postbiotickým účinkom a jeho aplikácia u koní**

Eva Bino

Centrum biovied SAV, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

14:45 – 15:00

Koncept personalizácie a optimalizácie mikrobiómu

Alojz Bomba

Perbiotix microbiome solutions, Kysucké Nové Město; ARCOBIOME Advanced Research Center of Microbiome, Košice

15:10 – 16:00 Exkurze do Potravinářského pavilonu – zájemci se hlásí u registrace

Přednášky

Let's not forget the ocean – novel prebiotics for intestinal microbes

Clarissa Schwab

Department of Biological and Chemical Engineering, Aarhus University, Aarhus, Denmark

The observed link of health, diet/dietary fibre and gut microbiota has led to a renaissance of prebiotics to address a gap in nutrition caused by contemporary dietary habits. Prebiotics are defined as substrates that are selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit. Brown seaweed is a source rich in unique and complex carbohydrates that differ from terrestrial polysaccharides, which may increase the structural diversity of dietary fibre with a benefit for gut intestinal health. For e.g. the seaweed species *Fucus* contains alginate (1,4- β -D-mannuronic acid, α -L-guluronic acid), laminarin (1,3-1,6- β -glucose), and the unique fucoidan consisting mainly of 1,3-1,4- α -L-fucose, a deoxyhexose, with extensive branching. Results obtained by us suggest that the especially the monomer component of fucoidan, fucose, has the potential to act as selective substrate for microbial fermentation, while the polymers fucoidan and laminarin are not accessible in their natural form. Further processing with specific enzymes might generate fuco-oligosaccharides that can be selectively used by gut microbes. This presentation will show the current-state-of-the-art and will suggest further investigation strategies.

Keywords: prebiotics, seaweed, fucoidan

Podávání bakterie *Lactiplantibacillus plantarum*^{WJL} podporuje růst chronicky podvyživených mladých myší

Martin Schwarzer

Laboratoř gnotobiologie, Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Nový Hrádek

Je známo, že střevní mikrobiom ovlivňuje postnatální růst. My jsme ukázali, že specifický kmen *Lactiplantibacillus plantarum* (LpWJL) je schopný zmírnit nepříznivé účinky chronické podvýživy na růst juvenilních bezmikrobních myší (1). Je ale schopnost LpWJL podporovat růst zachována také u konvenčních zvířat, tj. zvířat se střevním mikrobiomem? Při hledání odpovědi na tuto otázku jsme zjistili, že podávání LpWJL zlepšuje postnatální růst podvyživených konvenčních zvířat a podporuje produkci a aktivitu jak inzulínu podobného růstového faktoru-1 (IGF-1), tak i inzulínu. Dále jsme ukázali, že podávání buněčné stěny izolované z LpWJL je dostatečný podnět ke stimulaci růstu zvířat navzdory podvýživě. K tomu byla zapotřebí intaktní signalizace přes intracelulární receptor NOD2 ve střevních epitelálních buňkách. Myši, které dostávaly bakterii LpWJL měly signifikantně vyšší proliferaci buněk v kryptách tenkého střeva, vyšší indukci genů regulovaných interferonem I. typu a vyšší produkci IGF-1. Naše výsledky ukazují, že bakteriální buněčné stěny nebo purifikované ligandy receptoru NOD2 signalizují přes tento receptor a udržují postnatální juvenilní růst navzdory chronické podvýživě (2). Předpokládáme, že jedním z mechanismů, kterými LpWJL a jeho buněčná stěna podporují postnatální růst, je tlumení negativních účinků podvýživy na proliferaci buněk v kryptách tenkého střeva a to se děje prostřednictvím signalizace přes receptor NOD2. Předpokládáme, že ve spojení s renutričními strategiemi má suplementace vybraných probiotických kmenů, jako je LpWJL, nebo suplementace definovaných postbiotik odvozených od bakterií, jako jsou buněčné stěny LpWJL a/nebo agonisté NOD2, potenciál zmírnit dlouhodobé následky podvýživy. Ta stále postihuje více než 149 milionů dětí mladších 5 let v zemích s nízkými a středními příjmy.

Klíčová slova: podvýživa, růst, IGF-1, inzulín, *L. plantarum*

Poděkování: Podpořeno grantem GAČR Junior Star 21-19640M a grantem MŠMT ČR Mluvíme s mikroby – porozumění mikrobiálním interakcím v konceptu One Health (CZ.02.01.01/00/22_008/0004597)

Citace:

- 1) Schwarzer, M., et al., *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science* (New York, N Y), 2016. 351(6275): p. 854-7.
- 2) Schwarzer, M., et al., *Microbe-mediated intestinal NOD2 stimulation improves linear growth of undernourished infant mice*. *Science*, 2023. 379(6634): p. 826-833.

Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lacticaseibacillus paracasei* supplementation on the single-cell fecal parasitome in children with celiac disease autoimmunity: a randomized, double-blind placebo-controlled clinical trial

Má probiotická suplementace efekt i na zastoupení prospěšných střevních prvoků u dětí s genetický rizikem celiakie?

Jakub Hurych^{1,2}, Elin Oscarsson³, Åsa Håkanson³, Kateřina Jirků-Pomajbíková⁴, Milan Jirků⁴, Carin Andrén Aronson⁵, Ondřej Cinek^{1,2} a Daniel Agardh⁵

^{1,2}Ústav lékařské mikrobiologie & Pediatriká klinika, 2.LF UK a FN Motol, Praha, ³Department of Food Technology Engineering and Nutrition, Lund University, Lund, ⁴Biologické centrum, Akademie věd ČR, Parazitologický ústav, České Budějovice, ⁵Celiac Disease and Diabetes Unit, Department of Clinical Sciences, Lund University, Malmö

Lactiplantibacillus plantarum HEAL9 a *Lacticaseibacillus paracasei* 8700:2 mají po šestiměsíční suplementaci pozitivní vliv na modulaci imunitního systému a složení střevního bakteriom u dětí s genetickým rizikem celiakie (celiac disease autoimmunity, CDA). Cílem naší studie bylo sledovat vliv uvedených probiotických kmenů na jednobuněčný parazitom s primárním zaměřením na *Blastocystis* sp.

Analyzováno bylo 227 vzorků stolice od 78 švédských dětí s CDA, které se účastnily randomizované, dvojité zaslepené, placebem kontrolované klinické studie, ve které dostávaly suplementaci *Lactiplantibacillus plantarum* HEAL9 a *Lacticaseibacillus paracasei* 8700:2 (n=38), nebo placebo (n=40). Vzorky byly odebrány na začátku a po 3, resp. 6 měsících od intervence a byly analyzovány na přítomnost *Blastocystis* sp. pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR) a subtypizovány pomocí masivně paralelního amplikonového sekvenování. Ostatní jednobuněční parazité byli detekováni necíleným sekvenováním amplikonu 18S rDNA a ověřeni pomocí RQ-PCR. Vztah mezi parazity a bakteriomem byl charakterizován profilováním 16S rDNA oblasti V3-V4.

Byli identifikováni tři jednobuněční prvoci, nejvyšší prevalence byla u *Dientamoeba fragilis* (23,1 %, 18/78 dětí), následovaná *Blastocystis* sp. (15,4 %, 12/78) a *Entamoeba* sp. (2,6 %, 2/78). Množství prvoků bylo v průběhu času stabilní a nebylo ovlivněno probiotiky (p=0,14 pro *Blastocystis* sp., p=0,10 pro *D. fragilis*). Přítomnost prvoků ve stolici byla spojena se zvýšenou diverzitou bakteriomu (měřeno více indexy, vše p < 0,01). Složení bakteriomu bylo ovlivněno přítomností prvoků: pozitivita *Blastocystis* sp. byla inverzně asociována s rody *Akkermansia* (až na úroveň phylum; p = 0,001), *Faecalibacterium* (p = 0,003) a *Romboutsia* (p = 0,029); kdežto pozitivita *D. fragilis* byla inverzně asociována s čeleděmi Enterobacteriaceae (p = 0,016) a Coriobacteriaceae (p = 0,022) a rody *Flavonifractor* (p < 0,001), *Faecalibacterium* (0,009), *Lachnoclostridium* (0,029), *Ruminococcus* (p < 0,001) a *Granulicatella* (p = 0,018).

Prevalence *Blastocystis* sp. a *D. fragilis* u dětí s CDA je nízká. Navíc, jejich pozitivita ani kvantita se po probiotické intervenci nemění. Přítomnost prvoků je spojena se zvýšenou diverzitou bakteriomu a nepřímo souvisí se zastoupením některých prospěšných bakterií.

Přestože probiotika mohou dětem s CDA pomoci modulovat imunitní odpověď a pozitivně ovlivnit fekální bakteriom, jednobuněčný parazitom neovlivňují.

Klíčová slova: mikrobiom, Blastocystis, probiotika

Poděkování: Poděkování patří všem zúčastněným kolegům a podpoře projektu: Mezinárodní mobility výzkumných, technických a administrativních pracovníků na UK (č. CZ.02.2.69/0.0/0.0/18_053/0016976)

Fekální mikrobiální terapie v léčbě syndromu dráždivého tračníku - pro a proti aneb Co nového přinesla klinická studie MISCEAT?

Jiří Vejmelka

Interní klinika 3. LF UK a FTN, Praha

Syndrom dráždivého tračníku řadíme mezi onemocnění spjatá s disrupcí osy mikrobiota - střevo - mozek. Etiologie tohoto syndromu není doposud zcela objasněna. Inovativní léčebné přístupy jsou zaměřeny na modulaci střevní mikrobioty.

Klinická studie MISCEAT byla určena pacientům s průjemovým a smíšeným subtypem tohoto syndromu, byla aplikována celkem 4 klyzmata směsné dárcovské střevní mikrobioty. Studie byla dvojité zaslepena, ve skupině A byla podána 2 klyzmata živé mikrobioty a poté 2 klyzmata mikrobioty upravené autoklávováním, ve skupině B bylo pořadí aplikací opačné a ve skupině C byla aplikována inaktivovaná mikrobiota. Podání živé dárcovské mikrobioty vedlo k signifikantním změnám fekálního bakteriomu. Hodnotili jsme rovněž závažnost a změny klinických projevů, hs-CRP a další laboratorní markery, monitorovali jsme tělesné složení.

Sdělení hodnotí pozici fekální mikrobiální terapie v léčbě pacientů se syndromem dráždivého tračníku ve světle nových poznatků plynoucích z klinické studie.

Klíčová slova: syndrom dráždivého tračníku; fekální mikrobiální terapie

Poděkování: doc. MUDr. P. Kohoutovi, Ph.D., prof. MUDr. O. Cinkovi, Ph.D., MUDr. J. Hurychovi a celému týmu klinické studie MISCEAT

Dedikace: Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NV19-01-00127. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

Momentální stav posuzování probiotik a prebiotik v EU

Roman Švejstl^{1,2}

¹Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, ²Oddělení chemické bezpečnosti, Centrum Hygieny práce a pracovního lékařství, Státní zdravotní ústav, Praha

Evropská unie se z hlediska kvality potravin zaměřuje na zlepšení výživové situace evropské populace. K tomu napomáhá jak průběžné posuzování stávajících živin z hlediska doporučeného příjmu, tak i schvalování nových potravin, které historicky nebyly ve větší míře v Evropě konzumovány. Další hodnocení probíhá v oblasti zdravotních tvrzení, kde však platí přísné podmínky, které se probiotik a prebiotik znatelně dotýkají. Tento příspěvek představí poznatky o problematice posuzování probiotik a prebiotik v EU.

Klíčová slova: EFSA, Novel food, Nové potraviny, legislativa

Poděkování: Podpořeno MZ ČR – RVO (Státní zdravotní ústav – SZÚ, IČ 75010330)

Stanovení přítomnosti probiotických bakterií v doplňcích stravy pomocí multiplexní MOL-PCR

Martin Klanica, Petr Králík

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Veterinární univerzita Brno

Dle WHO se probiotika definují jako živé organismy, které jsou zdraví prospěšné, když jsou podávány v adekvátním množství. Probiotické bakterie můžeme nalézt v některých běžných potravinách, ale zejména v kategorii potravin se specifickým určením, jež jsou označovány jako doplňky stravy. U této skupiny potravin jsou obsahy a druhy probiotik deklarovány na obale výrobku. Mezi nejpoužívanější rody řadíme *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* či bakterie mléčného kvašení.

Dozorovým orgánem kontrolujícím deklarované druhy, či obsah probiotických bakterií v potravinách je ve fázi prodeje Státní zemědělská a potravinářská inspekce, která je v souladu s rozdělením kompetencí podle zákona o potravinách a tabákových výrobcích č. 110/1997 Sb. v platném znění, k tomu věcně příslušná. Možnosti producentů a zejména dozorového orgánu jsou při ověřování deklarovaného obsahu jednotlivých druhů probiotických bakterií a zejména jejich množství dosud omezené. Obecně platí, že povinné i nepovinné údaje uvedené na obale musí odpovídat skutečnosti, už jen pro to, že je to podstatné pro rozhodnutí spotřebitelů o koupi či ne koupi potravin s obsahem probiotických bakterií.

Aktuálně používané kultivační metody z hlediska přesnosti, časové náročnosti i finanční nákladnosti nejsou bohužel pro toto stanovení ideální volbou. Alternativou ke kultivačnímu vyšetření jsou metody založené na qPCR. Při této metodě vyšetřování komplexních probiotických preparátů obsahujících vyšší jednotky nebo desítky druhů probiotických bakterií, je qPCR nepraktické z důvodu nutnosti analyzovat každý produkt na jiné spektrum bakterií.

V řešeném projektu MZe – Multiplexní detekce DNA probiotických bakterií a kvasinek v doplňcích stravy pomocí technologií xMAP a qPCR byla vyvinuta vysoce inovativní metoda multiplexní detekce druhů probiotických bakterií v doplňcích stravy MOL-PCR využívající princip suspenzních arrayů. Cílem bylo metodu optimalizovat, stanovit její citlivost a specifitu na referenčních vzorcích probiotik. V druhé fázi pak byla metoda validována na vzorcích probiotických doplňků stravy získaných v tržní síti a výsledky byly srovnány s referenční metodou qPCR a deklarací výrobce.

MOL-PCR je molekulárně biologická metoda založená na ligaci fragmentů DNA (molig) hybridizujících na specifické úseky DNA vybraných bakteriálních druhů. Po promytí nenavázaných molig jsou ligované fragmenty amplifikovány pomocí konvenční PCR s fluorescenčně značenými primery. Tyto amplifikáty jsou v posledním kroku hybridizovány na magnetické mikrosféry, které slouží jako nosič a zároveň identifikátor konkrétního bakteriálního druhu. Výsledkem je možnost prokázat přítomnost několika desítek různým bakteriálních druhů, které se mohou vyskytovat v doplňcích stravy jednou analýzou v přiměřeném čase za rozumné náklady.

V rámci prezentace budou představeny výsledky optimalizace a validace metody MOL-PCR. Ukázalo se, že MOL-PCR je použitelná pro potřeby stanovení jednotlivých bakteriálních druhů v probiotických doplňcích stravy. Zároveň bylo prokázáno, že technologii MOL-PCR je možné využít v dalších klinických a veterinárních aplikacích, které vyžadují stanovení velkého množství cílů.

Klíčová slova: MOL-PCR, probiotika, kultivace, qPCR

Poděkování: Práce vznikla v rámci řešení projektu MZe QK22020101 „Multiplexní detekce DNA probiotických bakterií a kvasinek v doplňcích stravy pomocí technologií xMAP a qPCR„.

Vliv způsobu přípravy ředících médií na kultivační počty bakterií v probiotických doplňcích stravy

Eva Vlková, Tereza Brousilová, Šárka Musilová, Věra Neužil Bunešová, Nikol Modráčková

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

Přestože je konzumace probiotických doplňků stravy aktuálním trendem, stále neexistují závazné legislativní požadavky upravující množství a druhové složení probiotických mikroorganismů v doplňcích stravy a nejsou dostupné ani platné postupy pro testování kvantitativního a kvalitativního zastoupení mikroorganismů v těchto produktech. Výrobce však musí dodržovat deklarované údaje. Společnost pro probiotika a prebiotika (SPP) provádí testování probiotických výrobků a potravin s obsahem probiotik prostřednictvím laboratoře Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ČZU v Praze podle platných norem a postupů popsanych ve vědecké literatuře. Podrobnosti o používaných metodách jsou dostupné na webu SPP www.probiotika-prebiotika.cz.

Vzhledem k tomu, že používané kmeny jsou většinou fakultativně anaerobní nebo striktně anaerobní, je nezbytné při jejich kultivačním stanovení zachovávat anaerobní podmínky při celém procesu. Existují různé možnosti přípravy ředících médií, které zajišťují eliminaci kyslíku z prostředí. Cílem práce bylo porovnat vliv různých způsobů přípravy ředících médií na kultivační počty bakterií v probiotických doplňcích stravy. Z výsledků vyplynulo, že všechny použité postupy jsou pro stanovení vhodné a není mezi nimi statisticky významný rozdíl. Lze tedy doporučit postup, který je časově a technicky nejméně náročný.

Klíčová slova: probiotické potraviny, bifidobakterie, laktobacily, kultivační stanovení, ředící médium

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory projektu MŠMT METROFOOD-CZ LM2023064.

LC-MS analýza krátkořetězcových mastných kyselin ve vzorcích myši stolice s využitím derivatizace

Anna Jelínková^{1,2}, Tommaso Stefani³, Martin Schwarzer¹, Zdenek Kameník³

¹Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Laboratoř gnotobiologie, Nový Hrádek, ²Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta University Karlovy, Praha, ³Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Laboratoř biologie sekundárního metabolismu, Praha

Krátkořetězcové mastné kyseliny (Short Chain Fatty Acids, SCFA) jsou organické kyseliny dlouhé 1-6 atomů uhlíku vznikající jako produkty fermentace střevní mikrobioty. Tyto produkty metabolismu anaerobních bakterií významně ovlivňují fyziologický stav hostitelského organismu a podílejí se na nastavení celkové homeostázi. Slouží jako hlavní zdroj energie pro kolonocyty, regulují nastavení metabolických drah v buňkách a funkci buněk imunitního systému. Díky nízké molekulové hmotnosti a polaritě tyto látky prostupují střevním epitelem a krví se rozšiřují v celém organismu. Ovlivňují funkci orgánů, včetně mozku a slouží jako signální molekuly na trase mozek-střevo. Stanovení těchto látek v komplexních matricích je v současnosti vyžadováno jak v rámci výzkumu, tak i v klinické medicíně.

Cílem této pilotní studie bylo sledovat přítomnost SCFA ve vzorcích stolice myši s různým mikrobiálním osídlením střeva pomocí derivatizace SCFA a následné analýzy produktů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS). Pro studium byly vybrány tři skupiny myši – bezmikrobní myši, konvenční SPF myši a myši monokolonizované bakterií *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*.

Během pilotní studie byl proveden odběr vzorků stolice myším kmene C57BL/6J s různým stupněm bakteriální kolonizace (bezmikrobní myši, myši monokolonizované bakterií *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* a konvenční SPF myši). Zároveň byl připraven vzorek se standardy 10 SCFA o koncentraci 1mg/ml. Následně byla provedena extrakce metabolitů v ACN:H₂O (50:50 v/v) v množství 10 µl/mg za použití sonikace a vortexu. Supernatanty byly podrobeny derivatizační reakci s 3-nitrophenylhydrazinem (3NPH) a alikvoty byly analyzovány pomocí LC-MS. Pro separaci byla použita gradientová eluce a chromatografická kolona s C18 ligandem.

V chromatogramech byly vyhledány hodnoty m/z odpovídající hydrazonovým derivátům jednotlivých SCFA. Přítomnost všech separovaných píků v chromatogramech jednotlivých látek ve vzorku se standardy potvrzuje úspěšné provedení derivatizace a umožnění analýzy těchto látek chromatografií na reverzní fázi. Ve vzorku stolice konvenčních myši byly detekovány 7 SCFA. Dle očekávání vzorek stolice bezmikrobních zvířat neobsahovala žádné SCFA kromě laktátu. Na základě úspěšné pilotní studie bude provedeno rozšíření o celkovou kvantitativní analýzu nejenom základních SCFA, ale také organických kyselin vznikajících v citrátovém cyklu, a následně interlaboratorní validace této metody.

Klíčová slova: SCFA, acetát, propionát, butyrát, LC-MS, mikrobiom

Poděkování: Práce byla podpořena projektem MŠMT České republiky Mluvíme s mikroby – porozumění mikrobiálním interakcím v konceptu One Health (CZ.02.01.01/00/22_008/0004597).

Příprava extracelulárních vezikul izolovaných z kmene *Escherichia coli* O83:K24:H31 pro testování probiotického efektu v myším modelu indukované respirační alergie

Viktor Černý^{1,2}, Eliška Krčmářová¹, Michael Thaler², Anna Schmid², Agnieszka Razim², Jiří Hrdý¹, Irma Schabussová²

¹Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, ²Institut für Spezifische Prophylaxe und Tropenmedizin, Zentrum für Pathophysiologie, Infektiologie und Immunologie, Medizinische Universität Wien

Vzhledem ke své vysoké incidenci, potenciálně invalidizující či život ohrožující závažnosti i značnému dopadu na kvalitu života pacientů představují alergická onemocnění významný medicínský problém, jak v kontextu České republiky, tak celosvětově. V současnosti je většina alergických onemocnění navíc léčena nespecificky, resp. symptomaticky, anebo prostřednictvím režimových opatření (vyhýbání se expozici alergenu). To přináší značnou finanční zátěž pro zdravotnictví a rovněž dopadá na kvalitu života alergiků. Jedinou kauzální terapeutickou modalitou zůstává specifická alergenová imunoterapie. Výzkum v oblasti primární i sekundární prevence alergických onemocnění má proto značnou klinickou i společenskou relevanci.

Jednu ze slibných preventivních modalit představují probiotické kmeny bakterií, včetně probiotického kmene *Escherichia coli* O83:K24:H31 (EcO83; obsažena v probiotickém přípravku Colinfant Newborn), jejíž potenciál byl popsán jak v klinickém použití¹⁻³, tak v experimentálním myším modelu indukované respirační alergie⁴. Účinnost probiotické intervence je závislá na celé řadě faktorů, především věku podání (ideálně u rizikových jedinců časně postnatálně, v „okně příležitosti“) a také na cestě podání. U alergie, ale též obecněji v kontextu prevence infekčních onemocnění nespecifickou imunomodulací či specificky formou imunizace, se jako obzvláště vhodná jeví slizniční cesta. Intranasální podání má nejlepší potenciál pro ovlivnění dýchacích cest a prevenci respirační alergie⁴, vzhledem k anatomické i fyziologické blízkosti nosní sliznice a mozku je však podání živých mikroorganismů v této lokalitě vždy potenciálně závažným bezpečnostním rizikem.

Vhodné řešení by mohly představovat různé formy postbiotických preparátů odvozených z probiotických mikroorganismů. Obzvláště slibně se jeví extracelulární vezikuly (EV), drobné (řádově desítky – stovky nm) váčky tvořené lipidovou dvojvrstvou. Extracelulární vezikuly jsou uvolňovány všemi živými i umírajícími buňkami, jsou prakticky všudypřítomné a mohou obsahovat velké množství bioaktivního materiálu jako jsou membránové i cytoplasmatické proteiny, lipidy, nukleové kyseliny (DNA i RNA) a další molekuly včetně mikrobiálních signálů nebezpečí. Samotné vezikuly i jejich náklad jsou velmi odolné proti řadě fyzikálních, chemických i biologických vlivů a dokáží zprostředkovávat výměnu biologických informací na značné vzdálenosti, a to i přes biologické bariéry a mezi buňkami všech typů, napříč biologickými druhy i říšemi. Jedná se nicméně o entity, které nejsou schopné rozmnožování, jejich použití tedy eliminuje riziko infekce. EV uvolňované probiotickými mikrobiálními kmeny tak představují lákavou možnost zachování probiotického (imunomodulačního,...) efektu při použití vysoce bezpečného materiálu. Vzhledem k jejich

heterogenitě je nicméně značná potřeba důkladných studií jejich vlastností, biologické distribuce i efektu v živém modelu. EV byla popsána celá řada typů; v kontextu G – bakterií jako EcO83 jsou biologicky jednoznačně dominantní EV tvořené z vnější membrány (outer membrane vesicles; OMV), které mimo další biologický materiál obsahují také dominantní signál nebezpečí – lipopolysacharid (LPS).

V právě probíhající studii připravujeme OMV z kmene EcO83 za účelem studia jejich vlivu na průběh a závažnost v *in vivo* modelu ovalbuminem-indukovaného alergického zánětu dýchacích cest u myší. Kromě charakterizace OMV jako takových a hodnocení vlivu jejich preventivního podání na zánětlivé změny v dýchacích cestách (plicích) je plánovaná komplexní imunofenotypizace buněčných populací za použití průtokové cytometrie, analýza genové exprese a proteomická analýza OMV i biologických vzorků. V rámci projektu budou rovněž připraveny a analogicky studovány OMV z geneticky modifikovaných linií EcO83 s navázanými proteiny (fluorescenční značka mCherry, ovalbumin,...).

Poděkování: Práce byla podpořena z projektu MŠMT ČR programu OP JAK MSCA Fellowships CZ – UK2 reg. č. CZ.02.01.01/00/22_010/0008115 a 8J23AT019.

Citace:

- 1) Lodinová-Žádníková, R., et al., Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003, 131: p. 209–211.
- 2) Lodinová-Žádníková, R., et al., *Prevention of allergy in infants of allergic mothers by probiotic Escherichia coli.* *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2010, 153: p. 201–206.
- 3) Hrdý, J. et al. *Decreased allergy incidence in children supplemented with E. coli O83:K24:H31 and its possible modes of action.* *Eur. J. Immunol.* 2018, 48: p. 2015–2030.
- 4) Zwicker, C. et al. *Prophylactic and therapeutic inhibition of allergic airway inflammation by probiotic Escherichia coli O83.* *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018, 142: p. 1987-1990.

Vplyv humínových látok a *Limosilactobacillus fermentum* 2I3 na fagocytárnu aktivitu a rastové parametre svalstva u brojlerových kurčiat

Zuzana Kiššová¹, Viera Karaffová¹, Erik Hudec¹, Dagmar Mudroňová², Marek Ratvaj², Slavomír Marcinčák³, Martin Bartkovský³, Andrej Makiš³ a Martin Faldyna⁴

¹Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice,

²Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice,

³Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice, ⁴Výzkumný ústav veterinárneho lékařství, Brno

Chov hospodárskych zvierat zabezpečuje produkciu plnohodnotných potravín, vďaka metódam intenzívneho chovu je mäso lacnejšie a dostupnejšie avšak prináša mnohopočetné problémy v chove v podobe stresu, zníženej imunity a infekčných chorôb. Je dôležité mať na pamäti prírodné látky ako humínové zlúčeniny, éterické oleje alebo probiotiká, ktoré sú dôležitými doplnkami výživy a pomáhajú posilňovať imunitu. Cieľom štúdie bolo sledovať vplyv prídavku probiotického kmeňa *Limosilactobacillus fermentum* 2I3 a 0,6 % koncentrácie humínových látok a ich kombinácii na rastové parametre v pektorálnom svalstve a taktiež na fagocytárnu aktivitu v periférnej krvi u brojlerových kurčiat plemena Ross 308. V pokuse bolo zaradených 160 jednoduchých kurčiat, ktoré boli rozdelené do 4 skupín: kontrola (K), probiotická skupina (P) s prídavkom *L. fermentum* 2I3 (1×10^9 CFU/ml), skupina (H) s prídavkom 0,6 % humínových látok a kombinovaná skupina (PH). Účinok probiotík a humínových látok sme hodnotili pre fagocytárnu aktivitu z periférnej krvi pomocou komerčného setu IngoFlowEx Kit a oxidatívne splanutie fagocytujúcich buniek pomocou Phagoburst testu na prietokovom cytometri. Zo vzoriek pektorálneho svalstva sme analyzovali génovú expresiu pre gény kódujúce proteíny IGF2, MYF5 a transkripčný faktor PAX7. Výsledky poukazujú na zvýšenú fagocytárnu aktivitu a zvýšené oxidatívne splanutie imunitných buniek v probiotickej skupine. Zaujímavým zistením však je, že probiotiká neovplyvnili gény kódujúce rastové faktory v pektorálnom svalstve, ale naopak skupina zvierat, ktorá bola krmená krmivom s prídavkom 0,6 % humínových látok vykazovala najvyššiu expresiu sledovaných génov. V kombinovanej skupine sa neobjavil očakávaný potencujúci vplyv na nami sledované parametre, čo naznačuje potenciál pre ďalší výskum v tejto oblasti.

Kľúčové slová: fagocytárna aktivita, pektorálne svalstvo, brojler, qPCR, humínové látky

Podakovanie: Táto práca bola financovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. (APVV-21-0129) v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Autochtónne probiotiká vo výžive pstruha dúhového a imunologický dopad času ich aplikácie

Marek Ratvaj¹, Ivana Cingelová Maruščáková¹, Petra Schusterová¹, Natália Chomová¹ Peter Popelka², Jan Mareš³, Dagmar Mudroňová¹

¹Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Katedra mikrobiológie a imunológie, Košice,

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Košice, ³Mendelova univerzita, Ústav zoologie, rybárství, hydrobiologie a včelařství, Brno

Akvakultúra je rapídne rastúce odvetvie hospodárstva, s jej expanziou je však spojené aj vyššie riziko prepuknutia a prenosu infekčných ochorení. V súvislosti s produkciou potravín bezpečných pre spotrebiteľa je však obmedzené využívanie liečiv v akvakultúre, a tak je nutné hľadať nové metódy prevencie a boja s infekciami.

V tomto experimente sme skúmali relatívnu génovú expresiu imunologicky významných molekúl (interleukín 8 (IL8), imunoglobulín M (IgM) a transformujúci rastový faktor (TGF)) u pstruha dúhového po podávaní autochtónneho probiotického krmiva vyvinutého na pôde UVLF. Pstruhy boli rozdelené do nasledujúcich skupín: kontrolná skupina, ktorá dostávala komerčné krmivo, kontinuálna skupina, ktorá dostávala počas celého trvania experimentu probiotické krmivo a cyklická skupina, ktorá dostávala probiotické krmivo, avšak v rámci podávania bola prestávka v dĺžke 3 týždne. Odbery boli vykonané na 4., 7., 9. a 11. týždeň od začiatku podávania probiotík. Analýzy boli vykonané na vzorkách z hlavy obličky, žiabier a distálnej časti čreva. Relatívna génová expresia bola stanovená pomocou qPCR.

Relatívna génová expresia IL8 bola v hlave obličky zvýšená počas prvého odberu v cyklickej skupine a taktiež bola v tejto skupine zvýšená po znovupodávaní probiotík (3. odber). V žiabrach a čreve sme pozorovali rovnako zvýšenie v cyklickej skupine po znovupodávaní, avšak v čreve bola expresia tohto interleukínu znížená vo zvyšných odberoch u oboch skupín v porovnaní s kontrolou. Relatívna génová expresia IgM vykazovala podobnú dynamiku ako v prípade IL8; v hlave obličky a tiež žiabrach došlo k zvýšeniu pri 3. odbere. V čreve sme okrem počiatočného zvýšenia nepozorovali zmenu v experimentálnych skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou. TGF vykazovalo taktiež pri 3. odbere v hlave obličky vyššiu expresiu v cyklickej skupine v porovnaní s kontrolnou a kontinuálnou skupinou a rovnako tomu bolo aj v žiabrach a čreve pri 3. odbere.

V kontinuálnej skupine prakticky nedošlo ku signifikantnému zvýšeniu expresie sledovaných molekúl voči kontrolnej skupine počas celého experimentu, čo poukazuje na nízku mieru stimulácie imunitného systému týmto krmivom. Na druhej strane pri cyklickom podávaní sme zaznamenali zvýšenú expresiu odrážajúcu stimuláciu imunitného systému, ktorá by mohla byť zvlášť prospešná pri kritických obdobiach chovu rýb vyznačujúcich sa zvýšeným stresom a oslabením imunitného systému. Zároveň je tento krmný režim ekonomicky výhodnejší.

Kľúčové slová: akvakultúra, probiotiká, génová expresia

Podakovanie: Táto práca vznikla vďaka podpore projektu APVV-19-0234.

Postbiotický potenciál prospešných kmeňov *Enterococcus faecium* CCM8558, CCM7419 a CCM7420, nový prístup pre zachovanie kvality králičieho mäsa

Monika Pogány Simonová¹, Ľubica Chrastinová², Jana Ščerbová¹, Anna Kandričáková¹, Eva Bino¹, Valentína Focková¹, Zuzana Formelová², Andrea Lauková¹

¹Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice, ²Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Lužianky

Chov králikov je významným odvetvím živočíšnej výroby vďaka výnimočným vlastnostiam králičieho mäsa, ako je vysoký podiel stráviteľných bielkovín, polynenasýtených mastných kyselín, vitamínu B12 a nízky obsah cholesterolu aj sodíka. Preto sa králičie mäso považuje za základ racionálneho stravovania. Navyše, obohatením krmnej dávky králikov bioaktívnymi substanciami, teda pro-, pre- a postbiotikami a rastlinnými aditívami sa zlepši nielen zdravotný status a produktivita zvierat, ale zvýši sa aj nutričná kvalita králičieho mäsa, a preto môže byť považované aj za funkčnú potravinu. Králik je však veľmi senzitívne zviera, najmä obdobie odstavu predstavuje riziko náhleho zvýšenia morbidita/mortality a zhoršenej produktivity aj kvality mäsa zvierat. Príčinou týchto zmien je mikrobiálna dysbalancia v gastrointestinálnom trakte v dôsledku pôsobenia stresových faktorov, dietetických zmien, aplikácie antibiotík ale aj bakteriálnych, vírusových a parazitologických infekcií. Podávanie naturálnych substancií napr. bakteriocínov (antimikrobiálnych peptidov/proteínov produkovaných prospešnými baktériami) však môže výrazne redukovať výskyt týchto problémov v chove a optimalizovať tak zdravie aj produkciu zvierat. Cieľom tejto štúdie bolo preto simulovať podmienene patogénne prostredie aplikáciou biofilm-formujúceho kmeňa *Enterococcus hirae* Kr8⁺ a metilín-rezistentného (Met^R) kmeňa *Staphylococcus epidermidis* SEP3/Tr2a králikom. *In vivo* bol testovaný antimikrobiálny účinok enterocínu EntM produkovaného kmeňom *Enterococcus faecium* CCM8558 (environmentálny izolát AL41) na kmeň Kr8⁺ a EntA/P produkovaného kmeňom *E. faecium* CCM7419 (environmentálny izolát EK13) a Ent7420 produkovaného kmeňom *E. faecium* CCM7420 (králičí izolát EF2019) na Met^R kmeň SEP3/Tr2a a vplyv substancií na kvalitu mäsa u králikov. EntM bol aplikovaný do pitnej vody králikov (50 µl/zviera/deň; 12800 AU/ml) spolu s kmeňom Kr8⁺ (10⁸ KTJ/ml; 0,5 µl/zviera/deň), Ent7420 bol pridávaný (50 µl/zviera/deň; 25600 AU/ml) spolu s kmeňom Met^R SEP3/Tr2a (10⁵ KTJ/ml; 0,5 µl/zviera/deň) po dobu 21 dní a EntA/P (50 µl/zviera/deň; 25600 AU/ml) pred a po týždňovej aplikácii SEP3/Tr2a kmeňa (10⁵ KTJ/ml; 0,5 µl/zviera/deň). Podávanie podmienene patogénnych kmeňov Kr8⁺ a MET^R SEP3/Tr2a negatívne neovplyvnili jatočnú výťažnosť ani základné fyzikálno-chemické parametre a nutričnú kvalitu mäsa králikov. Optimalizácia hodnôt testovaných parametrov pri spoločnej aplikácii kmeňov s EntM, EntA/P a Ent7420 svedčí o ochrannom efekte týchto Ent pri predpokladanej bakteriálnej infekcii králikov, s dôrazom na zachovanie kvality králičieho mäsa.

Kľúčové slová: enterocín, králičie mäso, zdravie

Podakovanie: Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 2/0005/21. Ďakujeme pani D. Melišovej a pánovi P. Jergovi za pomoc pri spracovaní vzoriek.

***Enterococcus faecium* EF 412 s postbiotickým účinkom a jeho aplikácia u koní**

Eva Bino¹, Lenka Kosečková², Anna Kandričáková¹, Iveta Plachá¹, Monika Pogány Simonová¹,
Gabriela Štrkolcová³, Andrea Lauková¹

¹Centrum biovied SAV, v. v. i. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice, ²Prírodovedecká fakulta, RECETOX, Masarykova univerzita, Brno, ³Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Aj napriek rôznym zoohygienickým opatreniam sú v celosvetovom meradle jednou z hlavných príčin ekonomických strát v chovoch zvierat ochorenia vyvolané narušenou mikrobiotou čreva. Kone slúžili ľuďom odpradáva - či už na prácu, alebo na zábavu. V dnešnej dobe sú skôr využívané pre športové a rekreačné účely, prípadne hobby a agroturistiku. Chovatelia hľadajú nové riešenia na udržanie celkového zdravia chovaných zvierat; kedy je dôležité zamedziť či potlačiť výskyt patogénnej a ochorenia vyvolávajúcej mikrobioty v organizme aj prostredníctvom posilnenia imunitného systému. To je možné za pomoci prospešných baktérií alebo nimi produkovaných bioaktívnych substancií – bakteriocínov, ktoré najnovšie patria do skupiny postbiotík. Cieľom tejto štúdie bolo otestovať účinok autochtónneho, bakteriocín-produkujúceho fekálneho kmeňa *Enterococcus faecium* EF 412 u koní. Do experimentu bolo zaradených 12 zvierat rôzneho veku (od 5 do 13 rokov), slovenského teplokrvníka (6 kobýl a 6 koní). Rifampicínom značený kmeň EF 412 bol koňom podávaný v koncentrácii 10^9 KTJ/ml v dávke 1 g/zviera počas 3 týždňov v boluse z krmiva. Odber vzoriek bol na začiatku experimentu (deň 0/1), na 21. a 35. deň. Od každého koňa sa odobrali vzorky trusu na kontrolu mikrobioty (použitím metódy sekvenovania novej generácie a štandardnej mikrobiologickej metódy), kontroly parazitov, biochemických parametrov a krvi na fagocytárnu aktivitu. Najčastejšie zisteným fyloom v truse koní na 0/1. deň bol kmeň Bacteroidetes (36,6 %), nasledovaný kmeňom Firmicutes (29,3 %). Vajíčka *Strongylus* spp. a oocysty *Eimeria* spp. v truse koní neboli zistené a biochemické parametre boli vo fyziologickom rozmedzí. Zároveň sme zaznamenali stúpajúcu tendenciu fagocytárnej aktivity. Autochtónny fekálny kmeň *E. faecium* EF 412 preukázal sľubný aplikačný potenciál.

Kľúčové slová: kôň, *Enterococcus faecium*, antimikrobiálny účinok

Podakovanie: Výsledky boli dosiahnuté v rámci projektu VEGA č. 2/0006/17 a VEGA č. 2/0005/21. Zároveň ďakujeme kolegom zo Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre (prof. Marko Halo, prof. Branislav Gálik) za pomoc pri práci s koňmi a za umožnenie ich zaradenia do experimentu a Doc. Kováčikovi za analýzu krvi.

Koncept personalizácie a optimalizácie mikrobiómu

Alojz Bomba^{1,2}, Martin Haranta^{1,2}

¹*Perbiotix microbiome solutions, Slovensko*, ²*ARCOBIOME Advanced Research Center of Microbiome, Slovakia*

Črevná mikrobiota hrá veľmi dôležitú úlohu v regulácii dôležitých fyziologických funkcií organizmu a pri udržiavaní zdravia. Črevná dysbióza je spojená s mnohými chronickými ochoreniami. Terapia chronických ochorení väčšinou nezohľadňuje úlohu črevnej mikrobioty v etiológii a patogenéze chronických ochorení, čo znižuje jej účinnosť. Súčasný poznatky poukazujú na fakt, že modulácia črevnej mikrobioty môže byť účinným nástrojom ich prevencie a podpornej terapie. Napriek tomu, že rozmanitosť, zloženie a funkčnosť črevnej mikrobioty sú úzko prepojené, kľúčovým faktorom pre udržanie zdravia a zvýšenie účinnosti prevencie a terapie chorôb je optimálna funkčnosť črevného mikrobiómu. Z vyššie uvedených dôvodov by mala byť efektívna modulácia črevného mikrobiómu zameraná predovšetkým na optimalizáciu jeho funkčnosti. Vhodná kombinácia personalizovanej a cielenej modulácie črevnej mikrobioty na základe analýzy črevného mikrobiómu, metabolómu a klinických údajov pacienta môže byť efektívnym spôsobom optimalizácie funkčnosti črevného mikrobiómu (1). Na základe analýzy črevného mikrobiómu, metabolómu a klinických údajov pacienta je možné zostaviť vhodné konzorcium probiotických mikroorganizmov, zložiek potencujúcich ich účinok a metabolitov, s cieľom korigovať črevnú dysbiózu, znižovať negatívne účinky črevnej dysbiózy na hostiteľa, optimalizovať funkčnosť črevnej mikrobioty a pozitívne ovplyvňovať mechanizmy patogenézy ochorenia pacienta. Kľúčovým problémom je identifikácia analytických premenných, ktoré dokážeme ovplyvňovať intervenciou do mikrobiómu podľa vyššieho stupňa dôkazu v rámci GRADE framework.

Kľúčové slová: črevná mikrobiota, chronické choroby, prevencia a podporná terapia, personalizovaná medicína, probiotiká

Citace:

- 1) Bomba, Alojz, and Martin Haranta. *Personalized and Targeted Gut Microbiome Modulation in the Prevention and Treatment of Chronic Diseases*. Advances in Probiotics for Health and Nutrition. IntechOpen, 2023.

Postery

Probiotický kmeň *Enterococcus faecium* CCM 8558 a jeho vplyv na črevnú mikrobiotu v chove farmových pštrosov

Anna Kandričáková, Jana Ščerbová, Monika Pogányi Simonová, Andrea Lauková

Centrum biovied SAV, v. v. i. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

V súčasnosti patrí hydínové mäso z nutričného hľadiska k jednému z najviac preferovaných druhov mäsa. Chovatelia sa snažia čo najviac zaujať spotrebiteľskú verejnosť a chovajú sa aj také druhy hydiny, ktoré v minulosti v našich podmienkach bežne chované neboli ako napr. pštros dvojprstý. V súvislosti s rastúcou popularitou chovu pštrosov v Európe a teda i na Slovensku bol pštros dvojprstý v decembri 1995 v zmysle paragrafu 8 ods. 1 zákona č. 110/1972 o plemenitbe hospodárskych zvierat preradený z kategórie exotických zvierat do kategórie zvierat hospodárskych. Napriek tomu, že majú dospelé pštrosové dobre vyvinutý imunitný systém, náročný je odchov mláďat, ktoré môžu byť ohrozené rôznymi infekciami. Chovatelia sa usilujú podporovať a udržiavať dobrý zdravotný stav zvierat v chovoch, eliminovať výskyt ochorení v chove bez nadmerného zaťažovania organizmu chemickými látkami a bez zbytočného podávania antibiotík. Z hľadiska zdravia zvierat a rentability chovu je výhodnejšie zamerať sa na účinnú prevenciu. Jedným z možných preventívnych opatrení v chovoch hydiny je podávanie prospešných mikroorganizmov či probiotických prípravkov s obsahom prospešných/probiotických mikroorganizmov. Na základe prospešných účinkov v našich predchádzajúcich *in vivo* experimentoch pri aplikácii kmeňa *Enterococcus faecium* CCM 8558 viacerým druhom potravinových zvierat vrátane hydiny sme sa rozhodli aplikovať daný kmeň aj v chove farmových pštrosov. Tento Enterocín M-produkujúci kmeň bol aplikovaný v chove pštrosov po dobu 21 dní v pitnej vode. Experiment trval 42 dní. Na farme pštrosov bolo poskytnutých 86 zvierat (vek 1 – 3 týždne). Kmeň CCM 8558 preukázal stabilitu a dostatočne kolonizoval intestinálny trakt pštrosov. Antimikrobiálny účinok podávaného kmeňa bol preukázaný redukciami koaguláza-pozitívnych aj negatívnych stafylokokov, *Pseudomonas*-like a koliformných baktérií ($P < 0,001$). Antimikrobiálny účinok kmeňa CCM 8558 bol tiež demonštrovaný pri predchádzajúcich *in vivo* experimentoch, napr. u brojlerových kurčiat, pričom okrem antimikrobiálneho účinku bola zaznamenaná aj stimulácia nešpecifickej imunity.

Kľúčové slová: pštros dvojprstý, *Enterococcus faecium*, antimikrobiálny účinok

Podakovanie: Výsledky boli dosiahnuté v rámci projektov VEGA č. 2/0006/17 a VEGA č. 2/0005/21.

Autochtónne postbioticky aktívne kmene *Lactococcus lactis*, ich stabilita a prežívanie v jogurtoch z kozieho mlieka

Andrea Lauková, Natália Zábolyová, Eva Bino, Monika Pogány Simonová

Centrum Biovied SAV v.v.i. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

Bakteriálny druh *Lactococcus lactis* je jedným z najvýznamnejších druhov pre mliekarenský priemysel zo skupiny kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií. Významnou funkciou reprezentantov tohoto druhu v mliekarenskej produkcii je produkcia kyseliny mliečnej z laktózy, hydrolýza kazeínu a fermentácia kyseliny citrónovej. Takže produkty konečného metabolizmu kmeňov tohoto druhu a/alebo enzýmy priamo alebo nepriamo ovplyňujú textúru či chuť produktov. Medzi prospešné vlastnosti niektorých zástupcov laktokokov patrí produkcia antimikrobiálne pôsobiacich látok bielkovinovej povahy-bakteriocínov, ktoré sú v súčasnosti zaradované do skupiny postbiotík. Postbiotiká sú označované ako neživé bakteriálne produkty alebo metabolické produkty mikroorganizmov s biologickou aktivitou v hostiteľovi. Preto v tejto práci bolo testované prežívanie a stabilita postbioticky aktívnych autochtónnych kmeňov *Lactococcus lactis* MK2/2, MK2/7 a MK2/8 v jogurtoch z kozieho mlieka pre ich budúce aditívne uplatnenie. Kmene boli izolované zo surového kozieho mlieka. Ich taxonomické zatriedenie sekvenčnou BLASTn analýzou potvrdilo ich príslušnosť ku druhu *Lactococcus lactis* pri až 99.82% zhode s nukleotidovou sekvenciou typového kmeňa v GenBanku. Testované laktokoky sú bez hemolýzy (γ -hemolýza) a sú citlivé na testované antibiotiká. Kmene MK2/2 a MK2/7 prejavili nízku schopnosť tvorby biofilmu (0.122, 0.120) pri testovaní kvantitatívnou metódou. Kmeň MK2/8 túto schopnosť nemal. Pri probiotických kmeňoch je schopnosť formovať biofilm prospešnou vlastnosťou. Koncentrované bakteriocínové substancie z uvedených kmeňov (KBS) tzv. koncentráty vykázali inhibičný (postbiotický potenciál)-inhibíciu rastu až 94% indikátorových stafylokokov a enterokokov (častých kontaminantov mliekarenských produktov) pri inhibičnej aktivite do 400 AU/ml. Kmene dostatočne preživali v jogurtoch z kozieho mlieka (do 10^8 KTJ/g na 14. deň), pričom najvyššiu stabilitu preukázal kmeň MK2/8 (14. deň-8.1 KTJ/g log 10), z ktorého bola postbioticky najaktívnejšia aj KBS. V testovaní pokračujeme. Zástupcovia druhu *Lactococcus lactis* sú považovaní za všeobecne bezpečné kmene, ktoré sú okrem mliekarenskeho priemyslu využiteľné aj vo výžive potravinových zvierat.

Kľúčové slová: postbiotikum, laktokoky, kozí jogurt

Podakovanie: Práca bola podporená projektami č. APVV-20-0204 a APVV-17-0028 z Agentúry na podporu vedy a výskumu v SR. Rady by sme sa poďakovali pani Dane Melišovej za laboratórnu pomoc. Rovnako ďakujeme kolegom z Výskumného ústavu mliekarenskeho, a. s. v Žiline (Ing. M. Kološta PhD, Ing. M. Tomáška PhD a Ing. M. Drončovský) za poskytnutie kmeňov pre testovanie. Naše poďakovanie patrí aj Dr. Mariánovi Maďarovi a Dr. Natálii Šurín Hudákovej z Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach za sekvenčnú analýzu kmeňov.

Využitie enterocínov pre inhibíciu meticilín-rezistentných stafylokokov u voľne žijúcej zveri

Natália Zábolyová, Andrea Lauková, Monika Pogány Simonová

Centrum biovied SAV v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

Antibiotická rezistencia má globálny význam v oblasti verejného zdravia, pričom v ostatných rokoch predstavuje neustále rastúci problém nielen v humánnej medicíne, ale aj u hospodárskych/spoločenských zvierat. Rezistentné baktérie sa však dostávajú aj do prostredia nepriamo cez odpadové vody (stolica liečených ľudí) alebo priamo pri pestovaní rastlín (hnojivo). V dôsledku tejto migrácie môže voľne žijúca zver slúžiť ako významný rezervoár rezistentných baktérií, napríklad meticilín-rezistentných stafylokokov (MRS). Analýza vzoriek mikrobiómu voľne žijúcej zveri môže poskytnúť detailné pochopenie prenášania a šírenia rezistentných baktérií a tým prispieť k vypracovaniu efektívnych opatrení na minimalizáciu rizika prenosu antibiotickej rezistencie do, resp. v prírodnom prostredí. Sľubným riešením pre zamedzenie šírenia týchto baktérií v životnom prostredí sa javí využitie enterocínov, prírodných antimikrobiálnych látok bielkovinovej povahy produkovaných prospešnými baktériami, ktorých prospešný účinok bol doposiaľ potvrdený najmä u hospodárskych zvierat. Preto sme sa na základe našich predchádzajúcich výsledkov o výskyte MRS u hospodárskych/spoločenských zvierat rozhodli otestovať antibiotickú rezistenciu stafylokokov izolovaných z rôznych druhov voľne žijúcich zvierat ako aj ich citlivosť ku enterocínom. Kmene stafylokokov (113) boli izolované zo vzoriek trusu/tráviaceho traktu rýb (pstruh dúhový), bobrov, zubrov, sŕn a jeleňov. Najväčší podiel koaguláza-pozitívnych stafylokokov predstavoval druh *S. aureus* (14) a z koaguláza-negatívnych stafylokokov druhu *S. warneri* (22), *S. hominis* (18) a *S. haemolyticus* (17). Ak kmene vykázali rezistenciu na minimálne 2 z 3 uvedených antibiotík -meticilín (10 µg), oxacilín (1 µg) a cefoxitín (30 µg; Oxoid) používajúc agarovú difúznú metódu (CLSI, 2022) bol vytvorený súbor 46 MRS. Následne bola testovaná citlivosť týchto MRS ku čiastočne purifikovaným enterocínom (Ent): Ent A/P, Ent M, Ent 2019, Ent 9296, Ent 55, Ent 412, Ent EF9a, Ent K12b a Durancín ED26E/7 izolovaným a charakterizovaným v našom laboratóriu. Citlivosť ku Ent vykázalo takmer 85,0% MRS pri inhibičnej aktivite v rozmedzí 100-6 400 AU/ml. Najvyššia aktivita bola detegovaná v prípade Ent 9296, Ent A/P a Ent 2019. Kmeň *S. hominis* R/36/2 (izolát zo pstruha) bol najcitlivejší voči testovaným Ents vzhľadom na to, že bol inhibovaný najvyšším počtom týchto naturálnych substancií (8/9). Sedem kmeňov (15,5%) neprejavilo citlivosť voči pôsobeniu testovaných Ents. Možno konštatovať, že enterocíny predstavujú sľubné riešenie v predchádzaní šírenia rezistencie na antibiotiká. Ich prírodný pôvod a nepreukázaný reziduálny účinok otvárajú nové perspektívy pre efektívne riešenia v oblasti antimikrobiálnej terapie.

Kľúčové slová: antibiotická rezistencia, stafylokoky, enterocíny

Podakovanie: Tento projekt bol podporený projektom DoktoGrant APP0464.

Vplyv *Limosilactobacillus fermentum* 2i3 a 0,6 % prídavku humínových látok na vybrané imunitné a produkčné parametre u brojlerov

Hudec, E. ¹, Mudroňová, D. ², Ratvaj, M. ², Marcinčák, S. ³, Bartkovský, M. ³, Makiš, A. ³, Faldyna, M. ⁴, Karaffová, V. ¹

¹Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice,

²Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice,

³Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice, ⁴Výzkumný ústav veterinárneho lékařství, Brno

V posledných rokoch sa stali probiotické baktérie a humínové látky atraktívnymi v zmysle náhrady antibiotík, ktorých použitie, ako stimulátorov rastu, bolo zakázané v Európskej únii od roku 2006. Humínové látky sú prírodné organické zlúčeniny vznikajúce biologickým a chemickým rozkladom rastlinnej biomasy činnosťou mikroorganizmov. *L. fermentum* 2i3 je hydínový izolát, ktorý prejavil pozoruhodné imunomodulačné účinky v zmysle produkcie antimikrobiálnych látok, aktivácie receptorov, ktoré následne spúšťajú expresiu génov spojených s imunitnými reakciami.

Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv prídavku *L. fermentum* 2i3 ako aj 0,6 % koncentrácie humínových látok a ich kombinácie na génovú expresiu parametrov slizničnej imunity (IgA, IGF-2, Muc-2) v čreve, ako aj na produkčné parametre (hmotnosť kurčiat a priemerný denný prírastok, spotreba a konverzia krmiva). Do pokusu bolo zaradených 160 jednoduchých brojlerových kurčiat plemena Ross 308 rozdelených do 4 skupín: kontrola (K), probiotická skupina s prídavkom *L. fermentum* v dávke 10⁹ KTJ/ml (P), skupina s 0,6 % prídavkom humínových látok (H) a kombinovaná skupina (PH). Génová expresia bola stanovená pomocou Real-Time PCR metódy použitím Sybr green supermix a špecifických primerov na prístroji Lightcycler 480 II Instrument podľa preddefinovaného programu. Spotreba krmiva bola zaznamenávaná denne za každú skupinu a hmotnosť brojlerov bola vážená v týždňových intervaloch.

Zistili sme, že génová expresia pre IgA, IGF-2 ako aj Muc-2 bola upregulovaná v probiotickej skupine v porovnaní s ostatnými skupinami. Najvyššie denné prírastky aj najvyššiu hmotnosť pred zabitím dosahovali broilery v probiotickej skupine. Avšak, spotreba a konverzia krmiva nebola štatisticky významne ovplyvnená. Aplikácia *L. fermentum* 2i3 preukázala pozitívny vplyv na slizničnú imunitu čreva ako aj na produkčné parametre u brojlerov.

Kľúčové slová: imunita, *Limosilactobacillus*, humínové látky, brojlerové kurčatá

Podakovanie: Táto práca vznikla vďaka podpore projektu APVV-21-0129 a v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SiFood 313011V336, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Vplyv *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 na vybrané parametre v jejune brojlerových kurčiat

Viera Karaffová¹, Michaela Čechová¹, Erik Hudec¹, Martin Levkut, Viera Revajová¹, Zuzana Ševčíková¹, Róbert Herich¹, Renáta Szaboová², Rudolf Žitňan³

¹Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach,

²Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach,
Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Lužianky

V rámci používania naturálnych látok vo veterinárnej oblasti majú svoje stále zastúpenie najmä baktérie mliečneho kvasenia v rôznych aplikačných formách. Gram-pozitívny kmeň *Bacillus amyloliquefaciens* je fakultatívne anaeróbna baktéria so schopnosťou sekrécie mnohých enzýmov, čo môže zlepšovať produkčné parametre u brojlerov. Avšak v rámci komplexného pôsobenia prípravku ECOBIOL je potrebné sa zamerať hlavne aj na sledovanie jeho vplyvu na vybrané imunitné a morfometrické parametre v čreve brojlerových kurčiat.

Cieľom našej práce bolo sledovanie vplyvu *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 v preparáte ECOBIOL na génovú expresiu parametrov slizničnej imunity (Muc-2, IgA), epiteliálnych markerov (e-kadherín, cytokeratín 18, vilín, LGR5 receptor) ako aj na morfometrické parametre (hlbka krýpt, výška klkov, šírka klkov na báze a rezná plocha klkov) v jejune brojlerov.

60 kusov plemena ROSS 308 bolo rozdelených do 2 skupín (n= 30): kontrola a probiotická skupina, kde počas prvých 5 dní v liahni boli kurčatá 308 po vyliahnutí nasprejované probiotickým preparátom ECOBIOL (Evonik) a v druhej fáze dostávali daný prípravok v pitnej vode na farme v hale. Celkovo pokus trval 11 dní. Vzorky jejuna boli odoberaté na stanovenie génovej expresie do RNA lateru a na prípravu vzoriek pre morfometrickú analýzu boli vzorky najprv prepláchnuté v 0,09 % roztoku NaCl a potom skladované v 4% roztoku formaldehydu až do spracovania. Relatívna génová expresia vybraných parametrov bola stanovená pomocou kvantitatívnej RealTime-PCR metódy použitím kitu SsoAdvanced™ universal SYBR green supermix (Bio-Rad, USA) a špecifických primerov na prístroji LightCycler 480 II Instrument (Roche, USA) podľa preddefinovaného teplotného programu. Získané hodnoty C_q génov boli normalizované na priemernú hodnotu C_q referenčného génu (GAPDH) a relatívna expresia každého génu bola vypočítaná matematicky ako 2^{-AC_q}. Morfometrické parametre sa vyhodnocovali pod mikroskopom za použitia počítačového softvéru Nikon NIS-Elements AR 3.0.

Aplikácia *B. amyloliquefaciens* CECT 5940 zvýšila génovú expresiu vybraných parametrov oproti kontrole ($P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$). Zároveň mala významný vplyv na jednotlivé morfometrické parametre v jejune brojlerových kurčiat. Aplikácia *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 pôsobila blahodárne na sledované parametre v jejune brojlerov.

Kľúčové slová: *Bacillus amyloliquefaciens*, epiteliálne markery, slizničná imunita, brojlerové kurčatá

Podakovanie: Táto práca bola podporená grantovými úlohami VEGA č. 1/0098/22 a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-21-0129.

Imunitná odpoveď pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) po suplementácii novovyvinutým probiotickým prípravkom a následnej infekcii patogénom *Aeromonas salmonicida*

Natália Chomová¹, Marek Ratvaj¹, Ivana Cingelová Maruščáková¹, Peter Popelka², Adriána Fečkaninová³, Jana Koščová¹, Jan Mareš⁴, Ondřej Malý⁴, Rudolf Žitňan⁵, Martin Faldyna⁶, Dagmar Mudroňová¹

¹Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice, ²Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF, Košice, ³Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, UVLF, Košice, ⁴Ústav zoologie, rybárství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova univerzita, Brno, ⁵Národní zemědělské a potravinářské centrum, Výzkumný ústav živočišné výroby, Nitra, ⁶Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Cieľom štúdie bolo zistiť vplyv novovyvinutej pokrokovej formy rybej krmnej zmesi obsahujúcej autochtónny probiotický kmeň *Lactobacillus plantarum* R2 Biocenol™ CCM 8674 (new nom. *Lactiplantibacillus plantarum*) na imunitnú odpoveď pstruhov dúhových infikovaných *Aeromonas salmonicida*.

Ryby boli rozdelené do dvoch skupín. Obe boli infikované závažným patogénom pre akvakultúru – *A. salmonicida*. V probiotickej skupine bolo použité krmivo pre ryby s obsahom probiotík a kontinuálnym podávaním. Ryby boli počas celého trvania experimentu (11 týždňov) suplementované probiotikami. V kontrolnej skupine nebola použitá žiadna liečba. Infekcia sa uskutočnila ponorom v 7. týždni experimentu a vzorky sleziny na analýzu boli odobraté v 8. a 10. týždni. Skúmané boli hladiny vybraných imunologických molekúl. V probiotickej skupine výsledky z oboch odberov odhalili významný pokles prozápalových cytokínov (IL-1, TNF- α) a taktiež trend down-regulácie transkripčných hladín mRNA pre ďalšie kľúčové molekuly súvisiace so zápalom (IL-8, TLR9). V druhom odbere bola pozorovaná up-regulácia génov kódujúcich CD4 a CD8 molekuly, čo poukazuje na stimuláciu bunkovej imunity.

Možno konštatovať, že prídavok probiotík do krmiva môže významne modulovať imunitnú odpoveď a zmierniť progresiu infekcie. Suplementácia probiotikami potlačila zápal prostredníctvom regulácie prozápalových molekúl a stimulácie vrodenej bunkovej imunity. Počas kontinuálnej aplikácie probiotík nebola zaznamenaná nadmerná imunostimulácia, čo naznačuje, že probiotický premix je možné využiť v akvakultúre na prevenciu chorôb a moduláciu imunitnej odpovede v obdobiach zvýšeného stresu.

Kľúčové slová: probiotické krmivo, akvakultúra, qPCR, imunitná odpoveď

Podakovanie: Táto práca bola financovaná z projektu ERDF/ESF "Profish" [No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869, ČR] a slovenskou Agentúrou na podporu výskumu a vývoja s číslom zmluvy no. [APVV-19-0234].

Název: Sborník přednášek 18. Symposia Společnosti pro probiotika a prebiotika
Editoři: doc. Ing. Šárka Musilová, Ph.D., CSc. a prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Vydavatel: ČZU v Praze
Počet stran: 32
Rok vydání: 2024
Vydání: první
Počet výtisků: 200
Tisk: Sprinter-Studio s.r.o.
ISBN: 978-80-213-3373-4

Za obsahovou a jazykovou úpravu příspěvků odpovídají autoři.