

**SBORNÍK PŘEDNÁŠEK**  
**VII. SYMPOZIA**  
**SPOLEČNOSTI PRO PROBIOTIKA A PREBIOTIKA**

**28.3.2012**

**Kongresové centrum Ústřední vojenské nemocnice,  
Praha 6 – Střešovice**



**Pediatric  
for practice**

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**





PROGRAM VII. SYMPOZIA  
SPOLEČNOSTI PRO PROBIOTIKA A PREBIOTIKA

28.3.2012

Kongresové centrum Ústřední vojenské nemocnice  
Praha 6 – Střešovice

7,45 Registrace

DOPOLEDNÍ PROGRAM – I. ČÁST 8,45 – 10,45

**8,45 – 9,00 Zahájení**

Předsednictvo: Nevorál J., Frič P.

**9,00 – 9,45**

**Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis without organ failure**

M.C. van Baal<sup>1</sup>, Kohout P.<sup>2</sup>, Besselink M.G.<sup>3</sup>, H.C. van Santvoort<sup>3</sup>, Benes Z.<sup>2</sup>, Rijkers G.T.<sup>1</sup>, Gooszen H.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. Operating Room/Evidence Based Surgery, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, the Netherlands

<sup>2</sup>Dept. of Internal Medicine, Faculty Thomayer's Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup>Dept. of Surgery, University Medical Center, Utrecht, the Netherlands

**9,45 – 10,00**

**Probiotika u akutní pankreatitidy – světlo na konci tunelu**

Kohout P.<sup>1</sup>, Čermáková D.<sup>1</sup>, Beneš Z.<sup>1</sup>, van Baal M.<sup>2</sup>, Gooszen H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>II.interní klinika Thomayerova nemocnice Praha

<sup>2</sup>Surgical Dept. Radboud University Nijmegen

**10,00 – 10,15**

**Cena SPP 2012**

**Lyzát probiotické bakterie *Lactobacillus casei* dn-114 001 tlumí experimentální střevní zánět posílením integrity střevní bariéry a změnami ve složení střevní mikroflóry**

Zákostelská Z.<sup>1</sup>, Kverka M.<sup>1</sup>, Klimešová K.<sup>1</sup>, Rossmann P.<sup>1</sup>, Mrázek J.<sup>2</sup>, Kopečný J.<sup>2</sup>, Hornová M.<sup>1</sup>, Šrůtková D.<sup>1</sup>, Hudcovic T.<sup>1</sup>, Rídl J.<sup>3</sup>, Tlaskalová-Hogenová H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mikrobiologický ústav AV ČR Praha a Nový Hrádek, v.v.i.

<sup>2</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR Praha, v.v.i.

<sup>3</sup>Ústav molekulární genetiky AV ČR Praha, v.v.i.

**10,15 – 10,30**

**Výživová a zdravotní tvrzení**

Příbylová E.

Ministerstvo zdravotnictví ČR

**10,30 – 11,00 Přestávka - občerstvení**

DOPOLEDNÍ PROGRAM – 2. ČÁST 11,00 – 12,30

**Předsednictvo: Tlaskalová - Hogenová H., Šplíchal I.**

**11,00 – 11,15**

**Different immunomodulatory properties of bifidobacterial strains of human origin: importance of probiotic selection for the prevention of inflammation**

Šrůtková D.<sup>1</sup>, Schwarzer M.<sup>1</sup>, Dráb V.<sup>2</sup>, Hudcovic T.<sup>1</sup>, Španová A.<sup>3</sup>, Rittich B.<sup>3</sup>, Kozáková H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology ASCR, v.v.i.

<sup>2</sup>Milcom, Co. Ltd., Dairy Research Institute, Tábor

<sup>3</sup>Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno

**11,15 – 11,30**

**Neonatal colonization by *Bifidobacterium longum* prevents systemic sensitization to Bet v 1 in mouse gnotobiotic model of birch pollen allergy**

Schwarzer M.<sup>1</sup>, Šrůtková D.<sup>1</sup>, Schabussova I.<sup>2</sup>, Hudcovic T.<sup>1</sup>, Wiedermann U.<sup>2</sup>, Kozáková H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Nový Hrádek, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

**11,30 – 11,45**

**Mechanismus účinku probiotik při monokolonizaci bezmikrobních zvířat (GF) a při experimentální kolitidě vyvolané dextranulfátem (DSS)**

Kolínková J.

Fyziologický ústav AV ČR, Praha

**11,45 – 12,00**

***Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* z trávicího traktu psů**

Bunešová V.<sup>1</sup>, Ročková Š.<sup>1</sup>, Vlková E.<sup>1</sup>, Rada V.<sup>1</sup>, Kmeť V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, Praha 6 – Suchbátka

<sup>2</sup>Ústav fyziologie živočichů SAV, Košice

**12,00 – 12,15**

**Distribúcia obsahu *L. acidophilus* v acidofilnom mlieku počas štvorročného monitoringu**

Valík L., Liptáková D.

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave

**12,15 – 12,30**

**Střevní mikroflóra v raném dětství - význam probiotických bakterií pro rozvoj střeva a střevní imunity**

Nováková D.<sup>1</sup>, Paulová M.<sup>2</sup>, Burianová I.<sup>2</sup>, Čapková Š.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Klinika nukleární medicíny a endokrinologie 2. LF UK a FN Motol

<sup>2</sup>Novorozenecké oddělení FTN Krč

<sup>3</sup>Dětské kožní oddělení 2. LF UK a FN Motol

**12,30 – 13,30 Oběd**

*ODPOLEDNÍ PROGRAM – 13,30 – 15,00*

**Předsednictvo: Kohout P., Žádníková R.**

**13,30 – 13,45**

**Vliv probiotické vakcíny COLINFANT na proporční zastoupení a funkční vlastnosti regulačních buněk u šestiletých dětí**

Hrdý J.<sup>1</sup>, Novotná O.<sup>1</sup>, Kocourková I.<sup>2</sup>, Lodinová-Žádníková R.<sup>2</sup>, Prokešová L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze*

<sup>2</sup>*Ústav péče o matku a dítě*

**13,45 – 14,00**

**Indukce zánětové reakce při experimentální intraamniové infekci**

Šplíchal I., Šplíchalová A.

*Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Doly 183, 549 22 Nový Hrádek*

**14,00 – 14,15**

**Nový bakteriální rod čeledi *Bifidobacteriaceae* z trávicího traktu divokých prasat (*Sus scrofa*)**

Killer J.<sup>1,2</sup>, Mrázek J.<sup>1</sup>, Rada V.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>*Ústav živočišné fyziologie a genetiky v.v.i., AV ČR, Praha 4 – Krč*

<sup>2</sup>*Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, Praha 6 – Suchdol*

**14,15 – 14,30**

**Vliv probiotik na hladinu cholesterolu v séru Pražského hypercholesteromického potkana**

Bártová J.<sup>1</sup>, Šalaková A.<sup>2</sup>, Janatová T.<sup>1</sup>, Zajíček O.<sup>1</sup>, Klimešová K.<sup>3</sup>, Krausová K.<sup>3</sup>, Vannucci L.<sup>3</sup>, Rossmann P.<sup>3</sup>, Hofmanová B.<sup>3</sup>, Tlaskalová-Hogenová H.<sup>3</sup>, Poledne R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Ústav klinické a experimentální stomatologie, 1. LFUK a VFN, Praha*

<sup>2</sup>*Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha*

<sup>3</sup>*Mikrobiologický ústav ČAV, Praha*

<sup>4</sup>*IKEM, Praha*

**14,30 – 14,45**

**Probiotické vlastnosti mikrobiálních kultur izolovaných z fermentovaných zeleninových šťáv**

Eichlerová E., Čírtková V., Gabrovská, Winterová R., Erbán V.

*Výzkumný ústav potravinářský, Praha, v.v.i. Radiová 7, Praha 10, 102 31*

**14,45 – 15,00**

**Hodnocení probiotických výrobků Společností pro probiotika a prebiotika**

Rada V., Ročková Š., Bunešová V., Vlková E., Killer J.

*Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, Praha 6 - Suchdol*

SYMPOZIUM JE PODPOROVÁNO ČLENY PORADNÍ KOMISE SPP - FIRMAMI:

**Akacia Group, Ltd**

**ASP Czech, s.r.o.**

**Danone, a.s.**

**Dyntec , s.r.o.**

**Ferring Pharmaceuticals CZ, s.r.o.**

**Hero Czech, s.r.o.**

**Hipp Czech, s.r.o.**

**Nestlé Česko**

**Nutricia ČR, a.s.**

**Rougier, s.r.o.**

**S&D Pharmas CZ**

**Valosun, a.s.**

**Mediální partner - Logo Pediatrie pro praxi**

## PROBIOTIC PROPHYLAXIS IN PATIENTS WITH PREDICTED SEVERE ACUTE PANCREATITIS WITHOUT ORGAN FAILURE

M.C. van Baal<sup>1</sup>, Kohout P.<sup>2</sup>, Besselink M.G.<sup>3</sup>, van Santvoort H.C.<sup>3</sup>, Benes Z.<sup>2</sup>, Rijkers G.T.<sup>1</sup>,  
Gooszen H.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dept. Operating Room/Evidence Based Surgery, Radboud University Nijmegen Medical Centre,  
Nijmegen, the Netherlands*

<sup>2</sup>*Dept. of Internal Medicine, Faculty Thomayer's Hospital, Prague, Czech Republic*

<sup>3</sup>*Dept. of Surgery, University Medical Center, Utrecht, the Netherlands*

### **Background:**

The use of probiotics in acute pancreatitis has become highly controversial. Although initial studies suggested that probiotics could prevent infectious complications, a large randomized multicenter trial (PROPATRIA) found that probiotics may increase mortality in patients with predicted severe pancreatitis. As part of an ongoing research project to elucidate the latter unexpected findings we analyzed the use of probiotic prophylaxis in patients with predicted severe pancreatitis in Prague.

### **Objectives:**

To analyse the outcome of probiotic prophylaxis in patients with predicted severe pancreatitis in terms of infectious complications and mortality.

### **Methods:**

In this monocenter retrospective cohort study, patients with predicted severe pancreatitis (Ranson  $\geq 3$  or Imrie  $\geq 3$  or C-reactive protein  $\geq 150$  mg/L, all within 48h after hospital admission) were admitted to an internal medicine medium care facility of a teaching hospital in Prague from January 2003 to December 2010. After admittance, a nasojejunal feeding tube was inserted and a mixture of seven probiotic strains (Probioflora®) was administered twice daily during the whole hospital admission. Total parenteral nutrition was started immediately for 10 days with a gradual shift towards total enteral nutrition. Primary endpoint was the composite of infectious complications (i.e. infected pancreatic necrosis, bacteraemia, pneumonia) and mortality. Emphasis was placed on bowel ischemia as a complication of predicted severe pancreatitis (expected incidence 1-3%).

### **Results:**

9 consecutive patients with predicted severe pancreatitis were included. Male:female ratio was 1:1, with a median age of 56 years. Median time from hospital admission to the first dose of probiotics and start of enteral nutrition was both 4 days. Sixty patients (60%) developed necrotizing pancreatitis. Infectious complications occurred in 42 patients (42%): 40 patients (40%) were diagnosed with bacteraemia, 11 patients (11%) with pneumonia and ten patients (10%) with infected pancreatic necrosis. Eight patients (8%) died. Bowel ischemia was reported in two patients (2%), one of whom died.

### **Conclusion:**

Even with a high percentage of infectious complications, potentially due to the liberal use of parenteral nutrition, the overall mortality in this series is relatively low. The rate of bowel ischemia appears to be within the expected range but selection bias cannot be excluded. Because of the lack of a control group, no conclusions about the effects of the administered probiotics can be drawn.

## PROBIOTIKA U AKUTNÍ PANKREATITIDY – SVĚTLO NA KONCI TUNELU

Kohout P.<sup>1</sup>, Čermáková D.<sup>1</sup>, Beneš Z.<sup>1</sup>, van Baal M.<sup>2</sup>, Gooszen H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*II.interní klinika Thomayerova nemocnice Praha*

<sup>2</sup>*Surgical Dept. Radboud University Nijmegen*

### **Úvod:**

Složení střevní mikroflóry hraje u pacientů s akutní pankreatitidou důležitou roli při vzniku infekčních komplikací, při vzniku enterogenních sepsí a infikovaných nekróz. Podle výsledků multicentrických studií nevede antibiotická profylaxe ke snížení vzniku infekčních komplikací ani mortality, enterální výživa se zdá být vhodnou modalitou, přidání probiotik se zdálo do doby před provedením holandské multicentrické studie PROPATRIA vhodným postupem. Podle výsledků této studie však byla aplikace probiotik zatížena v daném souboru větší mortalitou a zvýšeným rizikem vzniku ischémie tenkého střeva ve srovnání s enterální výživou samotnou.

### **Metodika:**

Bylo provedeno retrospektivní zhodnocení 1 centra, které nezměnilo protokol léčby akutní pankreatitidy, kde pokračovalo užívání probiotik při léčbě akutní pankreatitidy.

### **Soubor pacientů:**

99 konsektivních pacientů s těžkou akutní pankreatitidou (kritéria odpovídala výběru pacientů ve studii PROPATRIA - Ranson nad 3, Imrie nad 3, CRP nad 150 mg/l) z roků 2003 – 2010 bylo zařazeno do sledování. Ve skupině bylo 46 mužů a 43 žen, průměrného věku 56 let. Probiotika (směsný preparát se 7 kmeny) byla podávána od 2. dne po přijetí, resp. přeložení na II. interní kliniku Thomayerovy nemocnice, pacienti dostávali časnou enterální výživu (od 2. - 4. dne). Parenterální výživa byla kombinována s enterální do doby, než bylo dosaženo potřebného příjmu energie a bílkovin.

### **Výsledky:**

Mortalita v našem souboru byla 8% (Propatria - 16% probiotika, 6% placebo), ischémie tenkého střeva se objevila pouze u 2% pacientů (srv. 6%, resp. 0%), infekční komplikace byly v našem souboru častější (objevily se u 42% pacientů ve srovnání s 30%, resp. 28

### **Závěr:**

Aplikace probiotik u akutní pankreatitidy dle naší retrospektivní studie nezvyšuje v našem souboru riziko ischémie tenkého střeva ani mortalitu – na rozdíl od studie PROPATRIA. Počet infekčních komplikací byl v našem souboru vyšší vzhledem k tomu, že v našem souboru nebyli všichni pacienti s akutní pankreatitidou léčeni od prvního dne na našem pracovišti, které má zavedený protokol. Retrospektivní zhodnocení 1 centra tak může vyvolat úvahy o provedení studie s probiotiky v léčbě akutní pankreatitidy s upraveným protokolem.



**LYZÁT PROBIOTICKÉ BAKTERIE *LACTOBACILLUS CASEI* DN-114 001  
TLUMÍ EXPERIMENTÁLNÍ STŘEVNÍ ZÁNĚT POSÍLENÍM INTEGRITY  
STŘEVNÍ BARIÉRY A ZMĚNAMI VE SLOŽENÍ STŘEVNÍ MIKROFLÓRY**

Zákostelská Z.<sup>1</sup>, Kverka M.<sup>1</sup>, Klimešová K.<sup>1</sup>, Rossmann P.<sup>1</sup>, Mrázek J.<sup>2</sup>, Kopečný J.<sup>2</sup>, Hornová M.<sup>1</sup>, Šrůtková D.<sup>1</sup>, Hudcovic T.<sup>1</sup>, Rídl J.<sup>3</sup>, Tlaskalová-Hogenová H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Mikrobiologický ústav AV ČR Praha a Nový hrádek, v.v.i.*

<sup>2</sup>*Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR Praha, v.v.i.*

<sup>3</sup>*Ústav molekulární genetiky AV ČR Praha, v.v.i.*

V současné době mají probiotika nezastupitelnou funkci v prevenci a léčbě zánětlivých onemocnění, mezi které patří i nespecifické střevní záněty (NSZ). Mechanismus jejich působení a účinné látky nebyly zatím dostatečně objasněny. Cílem této studie bylo zjistit, zda lyzát probiotické bakterie *L. casei* DN-114 001 (Lc) ovlivní průběh střevního zánětu v experimentálním myším modelu NSZ.

Na modelu akutní kolitidy indukované 3% dextransulfátem sodným (DSS) jsme prokázali, že preventivní perorální podávání bakteriálního lyzátu Lc zmírňuje průběh následně vyvolaného zánětu u myši kmene BALB/c. Tento efekt jsme neprokázali u imunodeficitních myší kmene SCID. Změřením koncentrace FITC-dextranu v krvi jsme zjistili, že u myší kmene BALB/c léčených Lc byla střevní paracelulární propustnost proteinů signifikantně snížena ve srovnání s kontrolní skupinou. Pomocí imunohistologické analýzy těsných spojů: ZO-1 a okludinu jsme zjistili, že exprese ZO-1 v kolon a ileu je zachována ve stejné míře, jakou můžeme pozorovat u zdravých myší. Expresí okludinu po preventivním podávání Lc nebyla zachována se statistickou významností, avšak určitý náznak zachování exprese můžeme pozorovat v kolon. Pyrosekvenací genu pro 16S rRNA jsme zjistili, že podávání lyzátu Lc vedlo ke změně složení střevní mikrobioty. Lyzát Lc také snižuje produkci prozánětlivých cytokinů IL-6, IFN- $\gamma$  a protizánětlivého cytokinu IL-10 v Peyerských plátech, céku a colon. Dále jsme zjistili, že podávání lyzátu Lc vedlo ke zvýšení počtu regulačních T buněk (CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) v mezenteriálních uzlinách. V systému *in vitro* bylo zjištěno, že kultivace buněk makrofágové linie s lyzátem LC zabraňuje lipopolysacharidem indukované produkci TNF- $\alpha$  cestou snížení NF- $\kappa$ B signalizační dráhy. Tento zajímavý protizánětlivý fenomén jsme studovali detailněji analýzou polarizace makrofágů pomocí průtokové cytometrie. Zjistili jsme, že lyzát *L. casei*, nikoli však lyzát *L. plantarum*, zabrání polarizaci makrofágů na M1 (F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>IL-7R<sup>+</sup>) fenotyp způsobený přidáním LPS.

Výsledky naší studie ukazují, že i neživý bakteriální lyzát izolovaný z kmene *Lactobacillus casei* DN 114001 je schopen ovlivnit průběh střevního zánětu. Mezi mechanismy tohoto působení patří modulace slizniční imunitní odpovědi, posílení integrity střevní bariéry a změny ve složení střevní mikroflóry.

## VÝŽIVOVÁ A ZDRAVOTNÍ TVRZENÍ

Příbylová E.

*Ministerstvo zdravotnictví ČR*

Dne 1. července 2007 se stalo použitelným nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 ze dne 20. prosince 2006 o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin. Toto nařízení bylo reakcí na stoupající počet potravin v rámci jednotného trhu, u nichž se při označování a v reklamě používají výživová a zdravotní tvrzení. Základním požadavkem je, aby potraviny, včetně dovážených potravin, uváděných na trh byly nejen bezpečné, ale aby byly rovněž náležitě označeny, tak aby se spotřebiteli dostalo pravdivých informací, které mu pomohou při výběru. Je nutné ale položit důraz na to, že základním předpokladem dobrého zdraví je různorodá a vyvážená strava, a jednotlivé výrobky mají z hlediska celkového stravování relativní význam.

Potraviny, které jsou propagovány pomocí tvrzení, mohou spotřebitelé vnímat jako produkty, které jsou ve srovnání s podobnými nebo jinými produkty, do nichž se tyto živiny a jiné látky nepřidávají, z výživového, fyziologického nebo jiného zdravotního hlediska hodnotnější. Toto často vede spotřebitele k rozhodnutím, která přímo ovlivní jejich celkový příjem jednotlivých živin nebo jiných látek způsobem, který by byl v rozporu s vědeckými podklady. Řada tvrzení o zdravotních nebo výživových účincích potravin, zejména v reklamě nebo prezentaci potravin, se dá považovat za sporná a ne vždy podložená.

Přístup ke zdravotním tvrzením na úrovni EU byl rozdílný, kdy některé kompetentní státy zdravotní tvrzení schvalovaly, ovšem na základě rozdílných kritérií, jiné přímo stanovovaly ve formě doporučení uvádění zdravotních tvrzení, ale většina pravidla pro uvádění tvrzení neměla vůbec zpracovány. Tato skutečnost vedla ke vzniku stále většího počtu sporů jednak mezi kompetentními úřady členských států, a jednak mezi osobami uvádějícími na trh potraviny s tvrzeními a kompetentním úřadem v členském státě. Navíc, v případě výživových a zdravotních tvrzení byly vytvářeny nerovné podmínky hospodářské soutěže, kdy někteří provozovatelé tento typ textů využívali k propagaci svých produktů bez ohledu na to, zda deklarovaný účinek je prokázán nebo ne, čímž na druhé straně byli poškozováni subjekty, které do výzkumu v oblasti potravin investovaly nemalé prostředky.

Vzhledem k pozitivnímu dojmu, který vyvolávají potraviny označené výživovými a zdravotními tvrzeními, a možnému vlivu těchto potravin na stravovací návyky a celkový příjem živin by spotřebitel měl být schopen posoudit jejich celkovou výživovou hodnotu. Z tohoto důvodu se proto stanoví povinnost uvést výživové označení vždy, je-li uvedeno zdravotní tvrzení, a to v souladu s požadavky směrnici Rady 90/496/EHS ze dne 24. září 1990 o nutričním označování potravin, a totéž platí, je-li v označení uvedeno výživové tvrzení. Výživové označení se uvádí v jeho rozšířené podobě (energetická hodnota, cukry, tuky, bílkoviny, nasycené mastné kyseliny, vlákninu a sodík). Výživová a zdravotní tvrzení jsou obecně údaji dobrovolnými, ale pokud se provozovatel rozhodne tato tvrzení používat, musí být postupováno v souladu s požadavky nařízení (ES) č. 1924/2006.

Všechna zdravotní tvrzení musí být schválena. Schválení probíhá na komunitární úrovni, čili od 1. července 2007 již žádný členský stát nemůže zdravotní tvrzení schvalovat, ale je vždy nutné zpracovat žádost o schválení zdravotního tvrzení, která se prostřednictvím kompetentního úřadu členského státu postupuje EFSA k vědeckému posouzení. Poté již probíhá přímá komunikace mezi žadatelem a EFSA, kdy si může vyžádat další doplňující informace nebo požadovat dodatečná vysvětlení a podklady. V případě pochybností, může požádat EFSA o stanovisko a doporučení postupu Komise a členské státy. Ke každé žádosti je EFSA

zpracováváno stanovisko, kdy k návrhu stanoviska lze zaslat připomínky do stanoveného termínu, a po vypořádání připomínek je pak zveřejňováno stanovisko konečné. Stanovisko EFSA je podkladem k dalšímu jednání v pracovních orgánech Komise (DG SANCO) o schválení zdravotního tvrzení. Komise je povinna na základě stanoviska EFSA zpracovat do dvou měsíců návrh právního předpisu, kterým se zdravotní tvrzení schvaluje nebo zamítá, který je předložen pro informaci členským státům a pak následuje diskuse o tomto návrhu. Většinou jsou zdravotní tvrzení schvalována jako tvrzení generická. Nicméně existuje zvláštní schvalovací postup pro případy, kdy žádost se předkládá na základě utajovaných informací nebo vlastnických práv, kdy se poskytuje pětiletá ochrana pro žadatele, kdy pouze tento žadatel může tvrzení uvádět na svých výrobcích. Tato ochrana je však časově omezená, aby nedocházelo ke zbytečnému opakování studií a zkoušek a aby se usnadnil přístup k tvrzením pro malé a střední podniky, které mají zřídka finanční kapacitu na provádění výzkumné činnosti.

V současné době jsou předmětem zájmu zejména funkční zdravotní tvrzení, tedy zdravotní tvrzení podle článku 13. Do 31. ledna 2008 v souladu s článkem 13 odst. 2 nařízení (ES) č. 1924/2006 zaslaly členské státy Evropské komisi národní seznamy zdravotních tvrzení, na jejichž základě byl vytvořen seznam komunitární, který byl postoupen EFSA k dalšímu hodnocení. Původně se předpokládalo zveřejnění jednoho seznamu poté, kdy EFSA vyhodnotí všechny položky na kompilovaném komunitárním seznamu, a přijetí tohoto seznamu se předpokládalo nejpozději do 31. ledna 2010, kdy však již v průběhu roku 2008 bylo zřejmé, že tento legislativní termín nelze dodržet.

Po prvních stanoviscích EFSA se ukázala řada problémů. Specifický problém představují mikroorganismy, kdy EFSA ve většině svých stanovisek konstatoval, že nebyly dostatečně charakterizovány a tudíž EFSA v jejich hodnocení nepokračoval. Z tohoto důvodu byly v podstatě negativně posouzeny všechny kmeny probiotických bakterií, kdy toto bylo EFSA zdůvodněno nedodáním charakterizace jednotlivých kmenů v souladu s materiálem WHO z roku 2002, a na skutečnost, že není jasně uváděno, kde jsou kmeny uloženy. Bohužel toto kritérium se objevilo ze strany EFSA až dodatečně, takže v původních podkladech nebylo skutečně doloženo. Na základě řady negativních reakcí bylo rozhodnuto o vytvoření tzv. „šedé“ zóny, kam byla nejprve zařazena všechna probiotika a následně po velkých diskusích i některé rostliny a rostlinné extrakty. Na druhé straně není ale možné, aby položky v „šedé“ zóně zůstávaly neúměrně dlouho, ale mělo by být dohodnuto časové omezení, do kdy je nutné předložit dodatečné podklady k novému hodnocení. Položky uvedené v tzv. „šedé zóně“ budou tedy znovu přehodnoceny.

Zdravotní tvrzení je možné uvádět pouze, pokud budou splněny podmínky použití, což je v podstatě stanovení způsobu konzumace potraviny, množství složky, které musí být v potravine obsaženo, nebo např. povolení jen pro některé potravinové matrice. Podmínky použití jsou nedílnou součástí povolení použití zdravotního tvrzení, a měly by být srozumitelné a snadno aplikovatelné jak pro provozovatele, tak i pro dozorové orgány.

Článek 28 nařízení (ES) č. 1924/2006 stanovuje několik přechodných období, z nichž řada již uplynula a nejsou aktuální, např. obecné přechodné období. Předmětem zájmu je přechodné období podle článku 28 odstavce 5, které souvisí s přijetím seznamu funkčních zdravotních tvrzení podle článku 13(1). V tomto případě bylo dohodnuto, že toto přechodné období musí běžet dál, protože nebyla splněna legislativní podmínka pro jeho uplynutí – tedy přijetí seznamu funkčních zdravotních tvrzení. V praxi to tedy znamená, že byla-li zdravotní tvrzení spadající pod článek 13(1) nařízení (ES) č. 1924/2006 nahlášena do seznamu funkčních zdravotních tvrzení některého z členských států a jsou v souladu s požadavky tohoto nařízení a v souladu s obecnými požadavky na označování potravin, lze taková tvrzení i nadále používat až do doby zveřejnění seznamu v Úředním věstníku a uplynutí šestiměsíčního přechodného období.

## DIFFERENT IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF BIFIDOBACTERIAL STRAINS OF HUMAN ORIGIN: IMPORTANCE OF PROBIOTIC SELECTION FOR THE PREVENTION OF INFLAMMATION

Šrůtková D.<sup>1</sup>, Schwarzer M.<sup>1</sup>, Dráb V.<sup>2</sup>, Hudcovic T.<sup>1</sup>, Španová A.<sup>3</sup>, Rittich B.<sup>3</sup>, Kozáková H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Immunology and Gnotobiology, Institute of Microbiology ASCR, v.v.i.*

<sup>2</sup>*Milcom, Co. Ltd., Dairy Research Institute, Tábor*

<sup>3</sup>*Faculty of Chemistry, University of Technology, Brno*

### Background:

Probiotic bacteria are considered to play an important role in health maintenance of the human gastrointestinal tract, and therefore they are used for the prevention and treatment of human inflammatory bowel diseases. One of the principal mechanisms of protection against inflammation is via suppression of Th1 pro-inflammatory responses and induction of regulatory cells (T<sub>reg</sub>).

### Methodology/ Results:

A) Ten bifidobacterial strains isolated from stool of healthy children with potential probiotic properties (resistance to bile salt and low pH) were identified as *B. longum* ssp. *longum* (three strains), *B. longum* ssp. *infantis* (one strain), *B. animalis* ssp. *animalis* (two strains) and *B. adolescentis* (four strains) using PCR-based methods.

B) *In vitro* study: Spleen and mesenteric lymph node cells were isolated from mice treated by dextran sodium sulfate (DSS) for seven days to induce experimental model of intestinal inflammation and from untreated controls. Cells were restimulated *in vitro* by bifidobacterial strains inactivated by 1% formaldehyde and the production of pro-inflammatory (IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and regulatory cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ) were analyzed in cell supernatants by ELISA. Different bacterial strains of the same species were able to exerted specific immunomodulatory properties which drove immune responses in the opposite alignment (Th1/T<sub>reg</sub>). The most promising strain *B. longum* ssp. *longum* CCDM 367 induced production of IL-10 both in spleen and MLN cells, while only low level of pro-inflammatory cytokines were detected.

C) *In vivo* study: The potential anti-inflammatory effect of *B. longum* ssp. *longum* CCDM 367 strain was studied in the experimental model of ulcerative colitis. Two-month-old BALB/c mice received *B. longum* by intragastric gavage for ten days before seven-day-lasting treatment with 2.5% DSS in drinking water. Controls received PBS only. Macroscopic signs (weight reduction, rectal bleeding, and stool consistency, shortening of colon length) and histological evaluation of the inflammation determined in colon descendens of both groups of mice were significantly reduced in mice treated by the strain CCDM 367 compared to controls. Pro-inflammatory cytokine response (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17) of spleen and MLN cells were determined by ELISA and were significantly lower in both spleen and MLN cells of mice treated with bifidobacteria. This was accompanied by increase of FoxP3+ regulatory cells in MLN assessed by flow cytometry.

### Conclusions:

The potential therapeutic effect of bifidobacteria is strictly strain dependent and therefore the exact characterization and determination of their immunomodulatory activity is highly desirable. We found, that the most promising strain *B. longum* ssp. *longum* CCDM 367 has the potential to prevent experimentally induced colitis and alleviate the symptoms of intestinal inflammation by the induction of regulatory immune response.

Supported by grant 303/09/0449 of the Science Foundation of the Czech Republic.

## NEONATAL COLONIZATION BY *BIFIDOBACTERIUM LONGUM* PREVENTS SYSTEMIC SENSITIZATION TO BET V 1 IN MOUSE GNOTOBIOTIC MODEL OF BIRCH POLLEN ALLERGY

Schwarzer M.<sup>1</sup>, Šrůtková D.<sup>1</sup>, Schabussova I.<sup>2</sup>, Hudcovic T.<sup>1</sup>, Wiedermann U.<sup>2</sup>, Kozáková H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic,  
Nový Hrádek, Czech Republic*

<sup>2</sup>*Department of Specific Prophylaxis and Tropical Medicine, Medical University of Vienna,  
Vienna, Austria*

### Background and Aims:

Microbial intestinal colonization in early life is regarded to play a major role for development and maturation of the immune system. Probiotic bacteria as modulators of the immune responses have been shown to reduce the risk of immune-mediated diseases, including allergic disorders. Immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* CCDM 367, isolated from the stool of healthy infant, were characterized *in vitro* by co-cultivation with murine dendritic cells and its prophylactic potential was evaluated in gnotobiotic mouse model of birch pollen allergy.

### Methods:

Wild-type and TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup> and MyD88<sup>-/-</sup> deficient mouse bone marrow-derived dendritic cells were stimulated with formalin inactivated *B. longum*. BALB/c mice were monocolonized by bifidobacteria immediately after birth naturally from their gnotobiotic mothers in plastic isolator. Two-month old monocolonized mice and age-matched germ-free controls were three times subcutaneously immunized with major birch pollen allergen Bet v 1/Alum in two-week interval. Mice were sacrificed one week after the last immunization.

### Results:

Stimulation of murine dendritic cells by *B. longum* induced only low levels of co-stimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 accompanied by production of IL-10, which was TLR2 and MyD88 depend. *Bifidobacterium*-colonized mice showed a significantly reduced level of allergen-specific antibody IgE, IgG2a, IgG1 and total IgE in blood sera compared to germ-free controls. On the contrary, the levels of TGF- $\beta$  were increased both in sera and intestinal gut lavage. Concomitantly *B. longum* colonization significantly reduced Bet v 1-induced proliferation of spleen cells and levels of IL-5, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 both in Bet v 1-stimulated spleen and MLN cell supernatants compared to germ-free controls.

### Conclusion:

Neonatal colonization by *B. longum* CCDM 367 prevents the development of allergen-induced sensitization and it is a promising probiotic candidate for prevention of allergic diseases. However, it remains important to evaluate whether early intervention with *B. longum* might interfere with active immune responses against infections or vaccines.

Supported by grant CZ.3.22/2.1.00/09.01574



EVROPSKÁ UNIE / UNIA EUROPEJSKA  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ / EUROPEJSKI FUNDUSZ ROZWOJU REGIONALNEGO  
PŘEKRAČUJEME HRANICE / PRZEKRACZAMY GRANICE

**MECHANISMUS ÚČINKU PROBIOTIK  
PŘI MONOKOLONIZACI BEZMIKROBNÍCH ZVÍŘAT (GF)  
A PŘI EXPERIMENTÁLNÍ KOLITIDĚ VYVOLANÉ DEXTRANSULFÁTEM (DSS)**

Kolínská J.

*Fyziologický ústav AV ČR, Praha*

V serii studií jsme ukázali, že kolonizace nezralých GF myší, potkanů a selat jediným probiotickým kmenem (*B. bifidum*, *E. coli* O83, *E. coli* O86) významně stimuluje rychlost obratu, migrační cyklus a diferenciaci enterocytů. Výsledkem je urychlení maturace digestivních funkcí (enzymů kartáčového lemu) a změn ve složení cukerných řetězců membránových glykoproteinů a glykolipidů tenkého střeva (modifikace sialylovaných a fukosylovaných struktur apikálních membránových glykoproteinů). Tím se tenké střevo monoasociovaných zvířat výrazně odlišuje od nezralého bezmikrobního střeva. Naopak se podobá střevu s konvenčním bakteriálním zastoupením. Zvýšení obratu enterocytů vlivem probiotika se děje stimulací a) proliferace, b) apoptozy; v této roli se významně uplatňuje zánětlivý cytokin TNF-alfa a jeho receptory. Produkce TNF-alfa je závislá na imunomodulační aktivitě mateřského mléka obsahujícího protizánětlivý cytokin TGF-beta. Mláďata monoasociovaných potkanů (s nepatogenním *E. coli*), která sají mléko svých monoasociovaných matek produkují výrazně nižší množství TNF-alfa než selata vyživovaná umělým mlékem.

V modelu chronické DSS kolitidy chrání Gram<sup>-</sup> *Bacteroides ovatus* imunodeficitní SCID myši (postrádají T a B buňky) před úhynem. Gram<sup>+</sup> *Clostridium tyrobutyricum* při intrarektální aplikaci chrání epitel colonocytů imunodeficitních SCID a imunokompetentních BALB/c myší před destrukcí barierových funkcí (proteiny pevných spojů, vrstvy mucínů) v akutním zánětu a před infiltrací makrofágů a neutrofilů. Manifestace zánětlivých cytokinů TNF-alfa a IL-18 při akutní kolitidě závisí na repertoiru imunitních buněk. TNF-alfa jako typický produkt makrofágů je zvýšen v epitelu colon u imunodeficitních SCID myší, u kterých konstitutivně vázaný IL-18 není v zánětu aktivován. Naopak zvýšená exprese IL-18, který polarizuje CD4<sup>+</sup> T buňky, má klíčovou roli v zánětu colon u imunokompetentních BALB/c myší. *C. tyrobutyricum* potlačuje zvýšené hladiny obou cytokinů, TNF-alfa a IL-18.

## **BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. LACTIS Z TRÁVICÍHO TRAKTU PSŮ**

Bunešová V<sup>1</sup>., Ročková Š.<sup>1</sup>, Vlková E.<sup>1</sup>, Rada V.<sup>1</sup>, Kmet' V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze*

<sup>2</sup>*Ústav fyziologie živočichov SAV, Košice*

Výskyt a hostitelská specifita bifidobakterií jsou velice rozmanité. Poddruh *B. animalis* ssp. *lactis* byl, podle dostupných zdrojů, prvně izolován z jogurtu [1]. V současnosti jsou kmeny *B. animalis* ssp. *lactis* nejčastěji používanými probiotiky v mléčných produktech.

Ze stolice dospělých psů a štěňat byly pomocí selektivního modifikovaného Wilkins-Chalgren agaru [2] izolovány kmeny bifidobakterií, které byly polyfázním přístupem identifikovány jako *B. animalis* ssp. *lactis*. Rodová příslušnost byla potvrzena pomocí testu na přítomnost enzymu fruktóza-6-fosfát-fosfoketolázy (F6PPK) a metodou PCR s použitím primeru Bif 164/ Bif 662 [3]. Dále byla provedena identifikace na druhovou úroveň pomocí primerů Bflac2/ Bflac5 a Lw-A/ Lw-B [4] navržených pro *B. animalis* ssp. *lactis*. Z chemotaxonomických metod identifikace byla použita hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpceí a ionizací za účasti matrice (MALDI-TOF MS). Jako pozitivní kontrola byl použit sbírkový kmen *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10104 a pět kmenů izolovaných z probiotických jogurtů. Pro vytvoření fingerprintových profilů byla použita metoda RAPD-PCR s primery 173 [5]; OPV-07; CRA 23 [4] a REP-PCR s primerem (GTG)<sub>5</sub> [6]. Kmeny *B. animalis* ssp. *lactis* izolované ze stolice psů měly pozitivní výsledek ve všech uvedených metodách a shodné fingerprintové profily se sbírkovým kmenem *B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10104 a s izoláty z probiotických jogurtů.

Práce byla podporována z projektu GAČR 523/08/1091.

- [1] Meile L. et al. 1997. Syst. Appl. Microbiol. 20, 57–64.
- [2] Rada V., Petr J. 2000. J. Microbiol. Meth. 43, 127–132.
- [3] Roy D., Sirois S. 2000. FEMS Microbiol. Lett. 191, 17–24.
- [4] Mayer H.K. et al. 2007. Int. Dairy J. 17, 565–573.
- [5] Sakata, S. et al. 2002. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1945–1951.
- [6] Gevers D. et al. 2001. FEMS Microbiol. Lett. 201, 31–36.

## **DISTRIBÚCIA OBSAHU *L. ACIDOPHILUS* V ACIDOFILNOM MLIEKU POČAS ŠTVORROČNÉHO MONITORINGU**

Valík L., Liptáková D.

*Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave*

V rokoch 2007-2010 sme stanovovali obsah *L. acidophilus* a ostatných baktérií mliečného kysnutia v 766 vzoriek acidofilného mlieka na konci doby spotreby. Vzhľadom na to, že mikroflóra tohto kyslomliečného výrobku obsahovala len laktokoky, na stanovenie počtov *L. acidophilus* sme z troch testovaných médií mohli vybrať metódu anaeróbnej kultivácie na MRS agare s okyselením na pH 5,7. V práci sú prezentované výsledky základného štatistického hodnotenia obsahu *L. acidophilus* v kyslomliečnom výrobku, vrátane ich distribúcie. Zistené boli nasledovné priemerné hodnoty v log KTJ/g v poradí od r. 2007 do r. 2010:  $6,85 \pm 0,69$  (n=146),  $7,47 \pm 0,45$  (n=199),  $7,42 \pm 0,21$  (n=220),  $7,31 \pm 0,18$  (n=201). Výsledky monitorovania poukázali na užitočnosť sledovania obsahu probiotického kmeňa v kyslomliečnom výrobku na konci jeho doby spotreby. Na základe výpovednej hodnoty takmer 800 analyzovaných môžeme konštatovať, že konkrétny výrobok dlhodobo spĺňal, kritériá sledovaného ukazovateľa. Potvrdil to aj klesajúci podiel vzoriek s obsahom *L. acidophilus*  $< 10^6$  KTJ/g na konci doby spotreby v poradí rokov od 2007 do 2010: 9,87%, 1,01%, 0%, 0%.



## STŘEVNÍ MIKROFLÓRA V RANNÉM DĚTSTVÍ - VÝZNAM PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ PRO ROZVOJ STŘEVA A STŘEVNÍ IMUNITY

Nováková D.<sup>1</sup>, Paulová M.<sup>2</sup>, Burianová I.<sup>2</sup>, Čapková Š.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Klinika nukleární medicíny a endokrinologie 2. LF UK a FN Motol*

<sup>2</sup>*Novorozenecké oddělení FTN Krč*

<sup>3</sup>*Dětské kožní oddělení 2. LF UK a FN Motol*

V zažívacím traktu dospělého člověka je velké množství mikroorganismů (přibližně 100 bilionů). Tyto mikroorganismy jsou s námi v symbiotickém vztahu. Jedná se o střevní mikroflóru, komensální bakterie, které nejsou patogenní a mají pozitivní účinky na zdraví hostitele. Mikroflóra komunikuje se střevní sliznicí a s vrozenou i adaptivní složkou imunity. Tato komunikace je nezbytná pro správnou funkci střeva, ovlivňuje mechanismy regulační diferenciací ve střevě, které jsou nutné pro imunitní toleranci. Imunitní tolerance je nastavována počátkem života a je pak udržována po celý život. Jestliže nedojde v ranném dětství k správnému nastavení tolerančních mechanismů, představuje to rizikový faktor pro rozvoj autoimunitních a alergických onemocnění. Složení střevní mikroflóry je silně ovlivněno zdravotním stavem a imunitou hostitele, ale také zevními vlivy, se kterými jedinec přichází do styku v prvním roce života.

Ve snaze o primární prevenci jsou nyní studovány v řadě epidemiologických a intervenčních studií možnosti jak pozitivně ovlivňovat vytváření zdravé mikroflóry, která bude příznivě ovlivňovat imunomodulační účinky ve střevě a bude prevencí možných alergických a autoimunitních onemocnění. Narůstá počet studií, ve kterých jsou pro tyto účely používány definované probiotické kmeny. Mechanismy působení probiotik mohou zahrnovat modulaci funkčních vlastností mikroflóry, buněk epitelu, dendritických buněk a dalších složek imunitního systému

Autorky podávají přehled aktuálních dostupných informací k této tématice.

## VLIV PROBIOTICKÉ VAKCÍNY COLINFANT NA PROPORČNÍ ZASTOUPENÍ A FUNKČNÍ VLASTNOSTI REGULAČNÍCH BUNĚK U ŠESTILETÝCH DĚTÍ

Hrdý J.<sup>1</sup>, Novotná O.<sup>1</sup>, Kocourková I.<sup>2</sup>, Lodinová-Žádníková R.<sup>2</sup>, Prokešová L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

<sup>2</sup>Ústav péče o matku a dítě

Alergická onemocnění patří mezi nejčastější onemocnění se stále rostoucí incidencí. Je známo, že užívání určitých probiotik může snižovat výskyt alergických onemocnění, ale mechanismus prospěšného působení probiotik na imunitní systém není dosud plně objasněn.

V naší studii jsme porovnali proporční zastoupení a funkční charakteristiky regulačních buněk v periferní krvi probiotikem osídlených a neosídlených dětí alergických matek (děti s vyšším rizikem vzniku alergických onemocnění) a neosídlených dětí zdravých matek (děti s relativně nízkým rizikem vzniku alergických onemocnění).

Děti byly osídleny probiotickou vakcínou Colinfant Newborn Dyntec (*Escherichia coli* O83:K24:H31) do tří dnů po narození a následně docházely na pravidelné kontroly k pediatrovi v Ústavu péče o matku a dítě. V šesti letech byly osídlené děti alergických matek a neosídlené děti alergických a zdravých matek rozděleny dle výskytu alergického onemocnění do šesti skupin. Proporční zastoupení a funkční vlastnosti regulačních buněk (medián intenzity fluorescence FoxP3, intracelulární přítomnost regulačních cytokinů IL-10 a TGF-beta) v periferní krvi dětí byly stanovovány pomocí průtokové cytometrie.

Ačkoliv jsme zjistili statisticky nevýznamně vyšší proporční zastoupení regulačních buněk v periferní krvi alergických dětí, funkční vlastnosti (intracelulární přítomnost IL-10 a TGF-beta, medián intenzity fluorescence FoxP3) regulačních buněk alergických dětí byly signifikantně nižší ve srovnání se zdravými dětmi. Funkční vlastnosti regulačních buněk osídlených dětí alergických matek byly podstatně vyšší ve všech námi sledovaných parametrech ve srovnání s regulačními buňkami neosídlených dětí alergických matek.

Osídlení dětí probiotickou vakcínou Colinfant snižuje výskyt alergie u dětí s vysokým rizikem vzniku alergických onemocnění. Zdá se, že prospěšný vliv probiotik na nezralý novorozenecký imunitní systém zahrnuje imunomodulaci funkčních vlastností regulačních buněk. Přestože jsme naměřili vyšší proporční zastoupení regulačních buněk v periferní krvi alergických dětí, funkční vlastnosti těchto regulačních buněk byly statisticky signifikantně nižší ve srovnání s nealergickými dětmi. Je možné předpokládat, že nižší funkční vlastnosti regulačních buněk alergických dětí jsou částečně kompenzovány jejich vyšším počtem.

Tato práce byla podpořena granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021620806, Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze GAUK 259911 a GAČR 310/08/H077.

## INDUKCE ZÁNĚTOVÉ REAKCE PŘI EXPERIMENTÁLNÍ INTRAAMNIOVÉ INFEKCI

Šplíchal I., Šplíchalová A.

*Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Doly 183, 549 22 Nový Hrádek*

Savčí plody se vyvíjejí ve sterilním prostředí dělohy matky. Intraamniové infekce, které jsou způsobovány viry, bakteriemi a prvoky, jsou častou příčinou předčasných porodů nedonošených dětí.

Bakterie, které se dostanou mimo místo svého obvyklého výskytu, často způsobují zánětovou reakci. Na prasečím modelu intraamniové infekce jsme srovnali translokaci, změny v indukci zánětových cytokinů (IL-8, IL-10 a TNF- $\alpha$ ) po inokulaci enteropatogenní *E. coli* O55 nebo probiotické *E. coli* Nissle 1917 do amniové tekutiny prasečích plodů na počátku posledního trimestru.

Při srovnatelném počtu CFU obou kmenů *E. coli* v amniové tekutině a krvi byl počet CFU ve střevě výrazně vyšší u kmene O55. Hladiny cytokinů v amniové tekutině byly u obou kmenů srovnatelné, zatímco hladiny v TNF- $\alpha$  plazmě plodů byly výrazně vyšší u *E. coli* Nissle 1917 ve sledovaném období 12 hodin po infekci. V případě kontrolních neinfikovaných plodů jsme nedokázali detekovat žádný ze sledovaných cytokinů.

Z výše uvedeného a z dostupných literárních údajů vyvozujeme, že podání probiotik může být problematické u jedinců s nedostatečně vyvinutým imunitním systémem.

Tato práce byla podporována grantem 524/09/0365 GAČR.

## NOVÝ BAKTERIÁLNÍ ROD ČELEDI *BIFIDOBACTERIACEAE* Z TRÁVICÍHO TRAKTU DIVOKÝCH PRASAT (*SUS SCROFA*)

Killer J.<sup>1,2</sup>, Mrázek J.<sup>1</sup>, Rada V.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky v.v.i., AV ČR, Videňská 1083, Praha 4 – Krč

<sup>2</sup>Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, Kamýcká 129, Praha 6 – Suchbátka

**Hypotéza:** trávicí trakt dosud neprozkoumaných volně žijících savců může být zdrojem nových probiotických bakteriálních kmenů s potenciálním využitím v chovech hospodářských zvířat.

Z trávicího traktu divokých prasat (*Sus scrofa*) bylo poprvé izolováno několik fruktózo-6-fosfát fosfoketoláza (specifický enzym pro bakterie čeledi *Bifidobacteriaceae*) pozitivních kmenů. Většina kmenů byla prostřednictvím sekvencí 16S rRNA genů (hlavního fylogenetického markeru u prokaryot) identifikována jako *Bifidobacterium boum*. Ovšem u některých kmenů, tvořících morfologicky spíše pravidelné tyčinky uspořádané ve dvojicích, byla zjištěna similarita 16S rRNA genů s nejbližšími druhy bifidobakterií  $\leq 94\%$ . Podle nových požadavků mezinárodního Komitétu pro systematiku prokaryot je třeba vyšetřit kmeny mající homologii 16S rRNA genů s nejbližšími příbuznými  $\leq 95\%$ , zda se nejedná o nové bakteriální rody. K tomuto účelu by měly sloužit především sekvence jiných fylogenetických markerů využitelných u konkrétních bakteriálních skupin (tříd, čeledí, rodů), na jejichž základě jsou postaveny fylogenetické analýzy a navíc také výsledky četných chemotaxonomických metod.

U výše zmiňovaných kmenů jsme tudíž sekvenovali geny *hsp60*, *xfp*, *fusA*, *gyrB*, *ileS*, *rplB*, *tuf* a *rpoC* a porovnali se sekvencemi dostupnými v genové databázi a navíc také se sekvencemi stejných genů skardoviálních (náležejících spolu s bifidobakteriemi do č. *Bifidobacteriaceae*) druhů získaných v naší studii. V případě *hsp60*, *xfp*, *fusA* a *gyrB* genů byly stanoveny pouze 75.7-82.8%, 72.3-81.2%, 73.1-81.4% a 65.8-78.6% podobnosti genů se zástupci čeledi *Bifidobacteriaceae*. U *ileS*, *rplB*, *tuf* a *rpoC* genů byly stanoveny opět nízké 77.5-80.0%, 83.8-87.9%, 88.1-89.5% a 80.0-82.7% podobnosti se sekvencemi získaných z kompletních genomů bifidobakterií. Jako hlavní celulózní mastné kyseliny u typového kmene označeného jako DPTE4<sup>T</sup> byly stanoveny C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>14:0</sub>. Dále bylo zjištěno také nižší zastoupení C<sub>18:0</sub>, C<sub>21:0</sub>, C<sub>20:0</sub>, C<sub>22:0</sub>, C<sub>17:0</sub> a C<sub>16:1</sub> mastných kyselin. Typem peptidoglykanu u kmene DPTE4<sup>T</sup> je A3β L-Orn(L-Lys)-L-Ser(L-Ala)-L-Ala<sub>2</sub>. Dva neznámé fosfoglykolipidy a fosfolipidy, dále glykolipid a diphosphatidylglycerol jsou hlavními celulózními polárními lipidy u kmene DPTE4<sup>T</sup>. Hodnota procentuálního zastoupení G(uaninu)+C(ytosinu) v genomu kmene DPTE4<sup>T</sup> je 51.8 mol%, což je hodnota nižší oproti hodnotám stanovených u většiny druhů bifidobakterií. Na základě výsledků fylogenetických, genotypových a fenotypových analýz navrhujeme ustanovit nový bakteriální rod č. *Bifidobacteriaceae*, *Pseudobifidobacterium suis* gen. nov., sp. nov. (typový kmen = DPTE4<sup>T</sup> = DSM 24744<sup>T</sup> = CCM 7942<sup>T</sup>).

## VLIV PROBIOTIK NA HLADINU CHOLESTEROLU V SÉRU PRAŽSKÉHO HYPERCHOLESTEROMICKÉHO POTKANA

Bártová J.<sup>1</sup>, Šalaková A.<sup>2</sup>, Janatová T.<sup>1</sup>, Zajíček O.<sup>1</sup>, Klimešová K.<sup>3</sup>, Krausová K.<sup>3</sup>, Vannucci L.<sup>3</sup>, Rossman P.<sup>3</sup>, Hofmanová B.<sup>3</sup>, Tlaskalová-Hogenová H.<sup>3</sup>, Poledne R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ústav klinické a experimentální stomatologie, 1. LFUK a VFN, Praha

<sup>2</sup>Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>3</sup>Mikrobiologický ústav ČAV, Praha

<sup>4</sup>IKEM, Praha

Probiotika jsou živé mikroorganismy aplikované orálně, které působí jako doplňky potravy blahodárně na zdraví člověka a zvířat. Nejčastěji používaná probiotika jsou lactobacily, bifidobakterie, *E. coli*, enterokoky, kvasinky.

V našem experimentálním modelu jsme sledovali možnost ovlivnění hladiny cholesterolu probiotiky v séru potkanů s vrozenou hypercholesterolemií (Pražský hereditárně hypercholesterolemický potkan, odvozený od kmene Wistar). Inokulovali jsme orálně živé bakterie zubního povlaku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) a probiotické bakterie *Enterococcus faecium* (E.f.).

### Cíl studie:

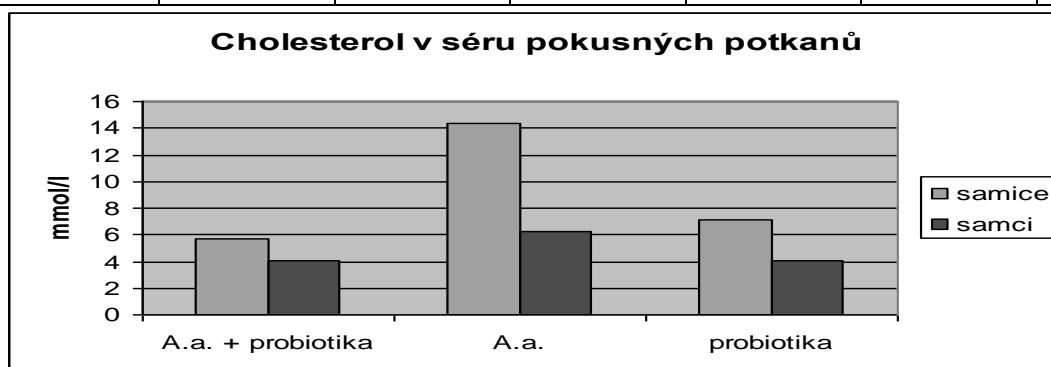
Sledovali jsme vliv pohlaví a orální aplikace bakterie *Enterococcus faecium* samotné nebo společně s A.a. na sérové hladiny cholesterolu u Pražského hereditárního hypercholesterolemického potkana.

### Materiál a metodika:

Samci a samice potkana Pražského hereditárního hypercholesterolemického potkana (PHHP), který se vyznačuje zvýšenou hladinou cholesterolu. Všechna zvířata byla na začátku pokusu ve věku 2 měsíce a na hypercholesterolové dietě, voda ad libitum.

### Schema pokusu:

Inokulace po dobu	Samci 6	Samice 6	Samci 6	Samice 6	Samci 6	Samice 6
1 měsíc	A.a.	A.a.	A.a.	A.a.	PBS.	PBS.a.
+1 měsíc	A.a. + E.f.	A.a. + E.f.	A.a.	A.a.	E.f.	E.f.



### Závěr:

Dvojnásobné zvýšení váhy jsme zaznamenali u skupiny samců PHHP v porovnání se samicemi. Čtyřtýdenní inokulace *Enterococcus faecium* ovlivnila hladiny sérového cholesterolu výrazně více u samic než u samců.

## PROBIOTICKÉ VLASTNOSTI MIKROBIÁLNÍCH KULTUR IZOLOVANÝCH Z FERMENTOVANÝCH ZELENINOVÝCH ŠŤÁV

Eichlerová E., Čírtková V., Gabrovská, Winterová R., Erban V.

*Výzkumný ústav potravinářský, Praha, v.v.i. Radiová 7, Praha 10, 102 31*

Práce byla zaměřena na fermentaci sterilních jednodruhových zeleninových šťáv přirozenou mikrobiální populací pocházející z fermentovaných směsných zeleninových šťáv. Přirozená mikrobiální populace byla testována na přítomnost potenciálně probiotických mikroorganismů. Podmínky pro selekci potenciálně probiotických mikroorganismů byly zvoleny dle intestinálního prostředí hostitele, tj. rezistence k žlučovým kyselinám, ke kyselému pH a nízkému pH šoku, k anaerobnímu prostředí. Výsledky ukazují, že mikroorganismy s probiotickými vlastnostmi se vyskytují v přírodě přirozeně.

Selekce potenciálně probiotických mikroorganismů ze směsných fermentovaných zeleninových šťáv byla provedena za vybraných selekčních tlaků; šok při pH 2, odolnost vůči nízkému pH, odolnost vůči žlučovým kyselinám (viz schéma zkoušení, tab. č.1 a tab. č.2). Přestože nejvíce prokysávají směsné šťávy C, F a A a nejméně prokysává šťáva D (viz tab. 1), nejlepším zdrojem bakteriálních populací pro výběr probiotických mikroorganismů jsou směsné šťávy D a E. Vyhodnocením průměrného poklesu pH se ukázalo, že šťávou s nejvýhodnějším zdrojem prebiotických živin jsou jednodruhové šťávy č.5 a 7. Dvě populace mikroorganismů s největším snížením pH, mající schopnost nejlépe přežívat a dostatečně se pomnožovat za těchto podmínek (viz tab.č.2), byly vybrány k dalším analýzám. Mikroskopickým vyšetřením bylo zjištěno, že v prvním případě se jedná o bakterie tvaru tyčinek a v druhém případě o kvasinky. Tyto kultury lze považovat za potenciálně probiotické a budou použity k dalším analýzám, jako je taxonomická analýza a stanovení fyziologických charakteristik.

## HODNOCENÍ PROBIOTICKÝCH VÝROBKŮ SPOLEČNOSTÍ PRO PROBIOTIKA A PREBIOTIKA

Rada V., Ročková Š., Bunešová V., Vlková E., Killer J.

*Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, ČZU v Praze, Praha 6 - Suchbátka*

SPP ([www.probiotika-prebiotika.cz](http://www.probiotika-prebiotika.cz)) zahájila testování probiotických potravin a potravních doplňků v roce 2009. Nejprve byly testovány bifidobakterie v mléčných kysaných výrobcích a lyofilizovaných prášcích, přičemž byl stanovován celkový počet živých buněk v průběhu expirační doby. Testování probíhalo podle IDF Standardu 220 (ISO/DIS 29981). Výrobky vesměs splňovaly normu, nebo množství deklarované na obalu. Kromě počtu živých buněk SPP provádí také izolaci čistých kultur a jejich identifikaci pomocí fenotypových a genotypových testů až na úroveň druhu, poddruhu a případně i kmene pomocí fingerprintových metod.

V dalších letech bylo zahájeno testování probiotických kmenů laktobacilů. Testovány byly opět hlavně mléčné kysané výrobky, které obsahují *Lactobacillus acidophilus*, *L.rhamnosus* a *L. casei*. Zejména posledně jmenovaný druh je hojně používán pro svoje imunostimulační vlastnosti. Počty *L. casei* ve výrobcích na českém trhu zpravidla splňují minimální hranici 1 milion živých buněk (6 log CFU) v 1 g výrobků, i když absolutní počty mezi jednotlivými produkty se liší.

SPP testuje také metody jak selektivně stanovit ostatní probiotické mikroorganismy jako jsou kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces boulardii*), enterokoky, *Escherichia coli* (v ČR jsou známy preparáty Mutaflor a Coliinfant) a další mikroorganismy. Všichni výrobci a distributoři probiotik se mohou obrátit na SPP s žádostí o test svého produktu. Je třeba připomenout, že testy probíhají nad rámec standardních metod a průběžně se zařazují nové metody pro stanovení množství živých buněk (např. RT-PCR, FISH, DGGE-PCR) a pro identifikaci druhů a kmenů (např. sekvence *hsp60*, MALDI-TOF). Případní zájemci také mohou kontaktovat přímo Laboratoř anaerobní mikrobiologie Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky ([rada@af.czu.cz](mailto:rada@af.czu.cz)) na ČZU v Praze, kde se testování pro SPP provádí.





Název	<b>SBORNÍK PŘEDNÁŠEK VII. SYMPOZIA SPOLEČNOSTI PRO PROBIOTIKA A PREBIOTIKA</b>
Editor	prof. MUDr. Jiří Nevoral, CSc., prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.
Vydavatel	ČZU v Praze
Počet stran	23
Rok vydání	2012
Vydání	první
Počet výtisků	150
Tisk	PowerPrint
ISBN	978-80-213-2271-4

Za obsahovou a jazykovou úpravu příspěvků odpovídají autoři.