



Probiotická bakterie
Streptococcus salivarius
kmen M18 a K12
ve stomatologické praxi

Probiotika pro zdravou dutinou ústní, dásně a zuby



Bactoblis®
VYROBENO PODLE ŠVÝCARSKÉHO PATENTU

favea+

Bactoral^{NEO}

Streptococcus salivarius K12

+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY
+ PRO ZDRAVÉ ZUBY

doplňek stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplnok pre dospelých a deti od 3 rokov

30
tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

SESTRNÝ K ZUBOM
testovaný

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

Obsahuje probiotickou kulturu **Streptococcus salivarius K12**, která tvoří peptidy salivaricin A2 a salivaricin B tzv. **bakteriociny**. Tato bakterie dokáže **zaujmout strategické pozice v dutině ústní**, nosohltanu a středouší a dokáže **vytěsnit nežádoucí druhy**. Studie dokazují, že Bactoral je schopen kolonizovat horní část dýchacích cest již 3 dny po prvním podání a udrží se na nich ještě 32 dní po vysazení. Vitamín D přispívá ke správné funkci imunitního systému. Kdy užívat Bactoral? Vždy, když potřebujete doplnit přátelskou mikrobiotu do dutiny ústní, nosohltanu nebo středouší např. po doužívání antibiotik a vždy, když potřebujete posílit imunitu. **Pro zdravé zuby a dásně.**

Dentoblis®
VYROBENO PODLE ŠVÝCARSKÉHO PATENTU

favea+

Bactodent

Streptococcus salivarius M18

+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY
+ PRO KRÁSNÉ A ZDRAVÉ ZUBY A DÁSNĚ

doplňek stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplnok pre dospelých a deti od 3 rokov

MÁTA
30
tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

SESTRNÝ K ZUBOM
testovaný

Mátová příchut'

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

Orální probiotikum s bohatým obsahem přátelské probiotické orální kultury **Streptococcus salivarius M18 pro péči o mléčné zuby, stálý chrup, pevné implantáty, dásně a celkově dutinu ústní**. Jedná se o stabilizovanou formu bakterie, která je přirozenou součástí mikrobioty v dutině ústní. Tato bakterie **dokáže obsadit povrch zubů** a tzv. periodontu i dásní a **omezit tak tvorbu škodlivého plaku**. Složení je optimálně kombinováno s obvyklou dávkou vitamínu D, který je nezbytný pro udržení zdraví organismu. Vitamín D přispívá k udržení normálního stavu zubů a normální funkci imunitního systému. Podílí se na procesu dělení buněk, které je klíčové pro imunitní odpověď organismu.



PRAGODENT

Navštivte náš stánek na mezinárodním
dentálním veletrhu **PRAGODENT** v areálu
PVA EXPO Letňany v termínu **9.–11.10.2025**

Doplňky stravy z naší nabídky dostanete
v lékárnách nebo na eshop.faveaplus.cz

VYROBENO PODLE
ŠVÝCARSKÉHO PATENTU



favea+
pro vaše zdraví

Obsah:

Prezentace Bactodent	2
Bactodent - Trojí účinek pro zdravé zuby a dásně	13
Sekvence genomu orálního probiotika <i>Streptococcus salivarius</i> , kmen M18, produkujícího bakteriocin	15
Výstup Cariogramu po 90 dní orální léčby pomocí <i>Streptococcus salivarius</i> M18 u dětí s vysokým rizikem zubního kazu: výsledky randomizované kontrolované studie	17
<i>Streptococcus salivarius</i> K12 inhibuje aktivaci imunitního systému patogeny parodontálního onemocnění	23
Inhibiční účinky <i>Streptococcus salivarius</i> K12 na tvorbu kariogenního biofilmu	32
Publikace je určena pro odbornou veřejnost	

Tříúrovňová ochrana s Bactorem Imuno

*Slizniční imunitní systém je klíčový. Chrání téměř celý vnitřní povrch lidského těla. Rozprostírá se od dutiny ústní přes hltan po gastrointestinální trakt. Bactoral Imuno je první kombinace dobře zdokumentovaných probiotických kmenů kolonizujících a chránících jak střevo - *Lactocaseibacillus paracasei*, **L. CASEI 431®**, tak sliznice úst a hltanu - *Streptococcus salivarius* K12 (**Bactoblis®**).*



1. úroveň – dutina ústní
působí v hlavním vstupním místě
patogenů (bakterie a viry)

**2. úroveň – systémová
ochrana**
vitamin D přispívá k normální
funkci imunitního systému

3. úroveň – střevo
působí na největší imunitní orgán
v těle (70 až 80 % imunitních
buněk těla se nachází ve střevě)

DOPORUČUJE
ODBOBNÁ SPOLEČNOST
PRAKTICKÝCH DĚTSKÝCH LÉKAŘŮ
ČESKÉ LÉKÁRSKÉ SPOLEČNOSTI JANA EVANGELISTY PURKYNĚ



favea +
pro vaše zdraví

www.faveaplus.cz



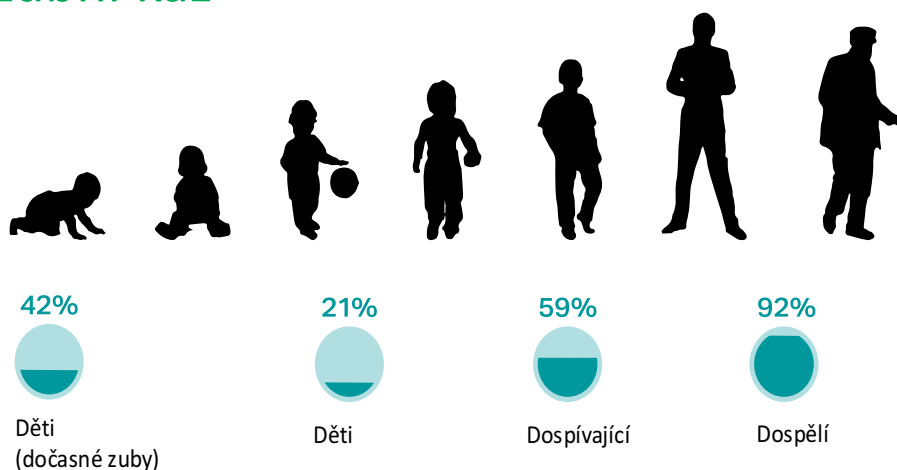
Trápí vás problémy s dásněmi a zuby?



Zátěž zubním kazem

2,43 miliardy lidí na celém světě mají zubní kaz

Bactodent
Dentoblis®



Vysoká prevalence u všech věkových skupin

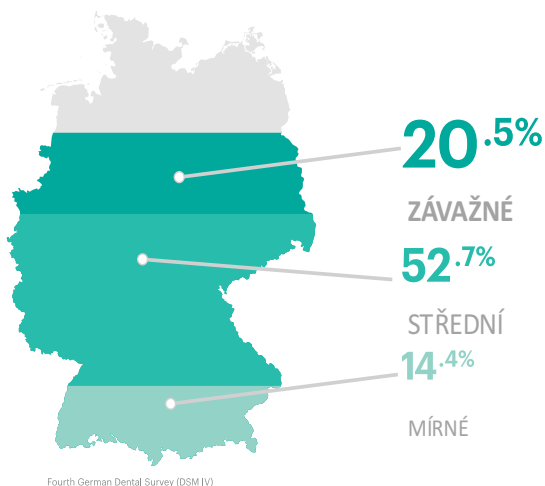
Vos et al. Lancet 2012; National Institute of Health

favea+
pro vaši zdraví

Bactodent 3/2025

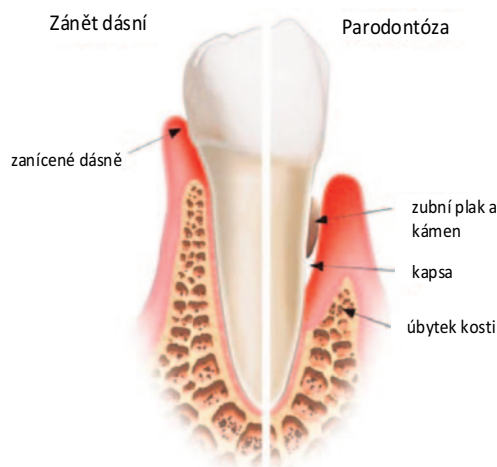
Výrazný nárůst míry prevalence (20-30 %)

Většina dospělých v Německu trpí
onemocněním dásní



Vymezení pojmů

- > **Zubní kaz**
 - změknutí tvrdé zubní tkáně a následná tvorba kavit
 - Parodontóza
- > **Zánět dásní**
 - zánět omezený na dásně
- > **Parodontóza**
 - trvalá ztráta parodontální tkáně



Multifaktoriální etiologie



Hlavní příčina: bakteriální nerovnováha

Bakteriální nerovnováha
Bakterie žijící v ústní dutině a ulpívající na zubech



Zánět dásní

Bakterie, např. *Porphyromonas gingivalis*,
vytvářející plak a vyvolávající zánět dásní

Zubní kaz

Bakterie, např. *Streptococcus mutans*,
produkující kyseliny z cukrů v potravě

Farmakoterapie: Antibakteriální léčba

- > **Denní hygiena**
 - Čištění zubů a používání zubní nitě pro redukci plaku
- > **Odstranění zubního kamene a subgingivální kyretáž**
 - Zubní lékař odstraní plak
- > **Medikace**
 - Antibakteriální ústní voda
 - Antibiotika
- > **Chirurgický zákrok**



favea +
pro vaše zdraví

Bactodent 1/2021

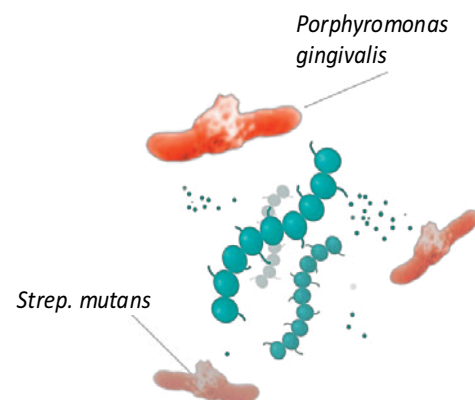
API – aktivní probiotická složka

Bakteriocinům podobné inhibiční látky (BLIS)

S obsahem orálního probiotického kmene BLIS M18™

- > detekovaný u zdravých lidí
- > unikátní kmen nejpočetnější bakterie vyskytující se v lidské ústní dutině - *Streptococcus salivarius*
- > bezkonkurenční a patentovaná aktivita BLIS proti ústním patogenům prostřednictvím bakteriocinům podobných inhibičních látek = antibakteriální látky

**Dentoblis® zajišťuje nejvyšší aktivitu BLIS
proti patogenům zubů a dásní**



favea +
pro vaše zdraví

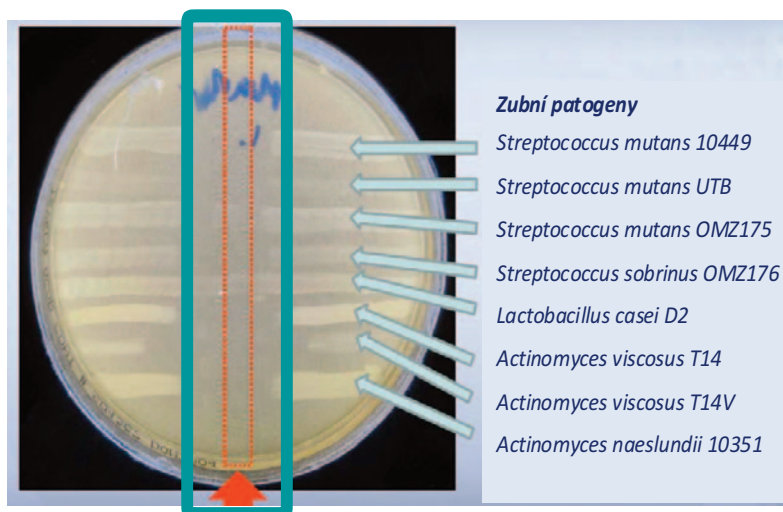
Bactodent 1/2021

Jedinečná ochrana proti patogenům

Selektivní antimikrobiální aktivita

Bactodent

Dentoblis



Zóna inhibice patogenů

Burton et al. 2013

favea+

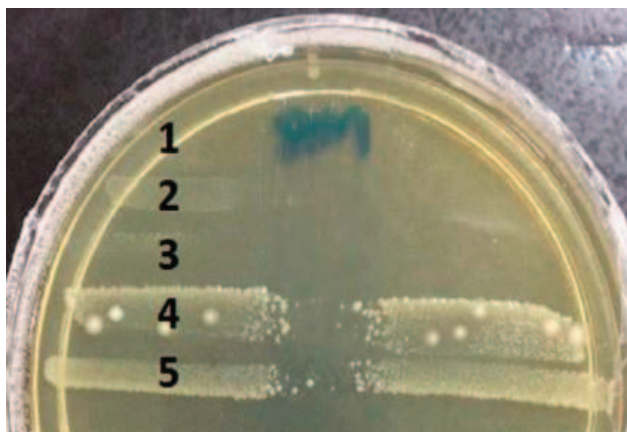
Bactodent 1/2023

Jedinečná ochrana proti patogenům

Selektivní antimikrobiální aktivita

Bactodent

Dentoblis



Periodontální patogeny	Inhibice pomocí M18	
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (n = 3)	++	(3/3)
<i>Prevotella intermedia</i> (n = 3)	+++	(3/3)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n = 2)	++	(2/2)

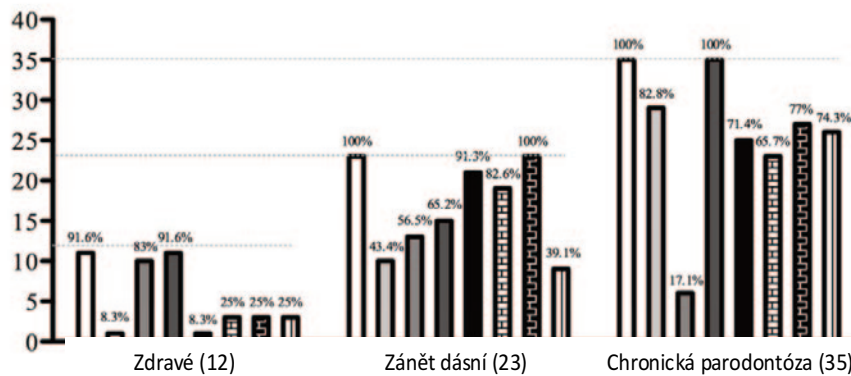
Zdroj: interní zpráva

favea+

Bactodent 3/2023

Selektivní antimikrobiální aktivita

Počet izolátů *A. actinomycetemcomitans*



Expres genů u *A. actinomycetemcomitans*

Periodontální patogeny	Inhibice pomocí M18
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4	+++
	++
	+++ (3/3)
	++ (3/3)
	++ (2/2)

Trojité ochrana

Mechanismus účinku

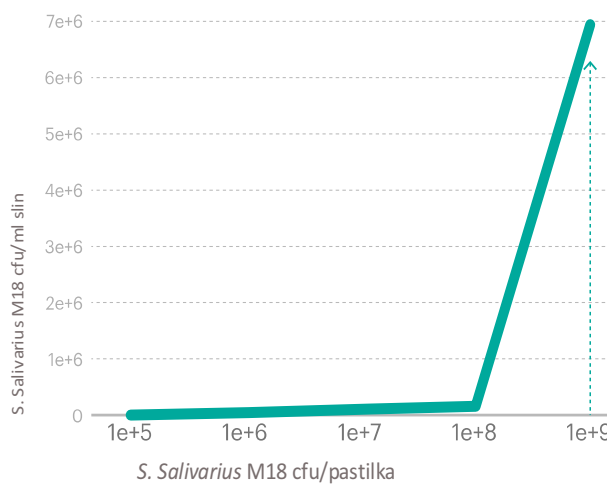
- > **Dextranáza:**
 - odbourává zubní plak (dextran je jedním z hlavních polysacharidů zubního plaku)
- > **Ureáza:**
 - neutralizuje kyselost
- > **Antibakteriální aktivita:**
 - patogeny dásní a zubů



Účinná kolonizace po 2 týdnech

Kolonizace u zdravých osob

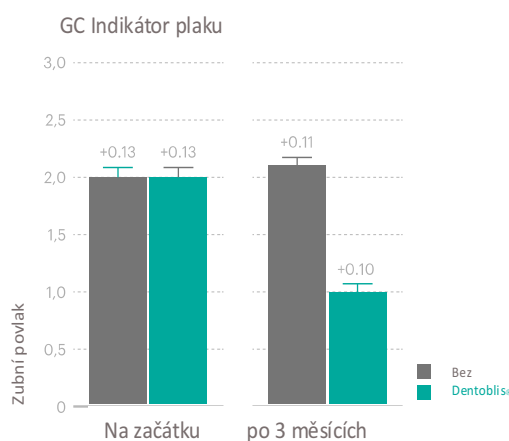
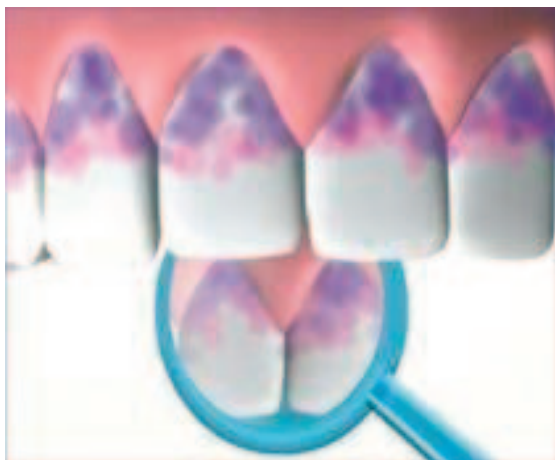
Hladiny ve slinách po konzumaci pastilek obsahující zvyšující se hladiny *Strep. salivarius* M18 (n = 17-20/skupina)



Burton et al. 2013, PLOS one e65991

Redukce plaku

Snížení rizika zubního kazu

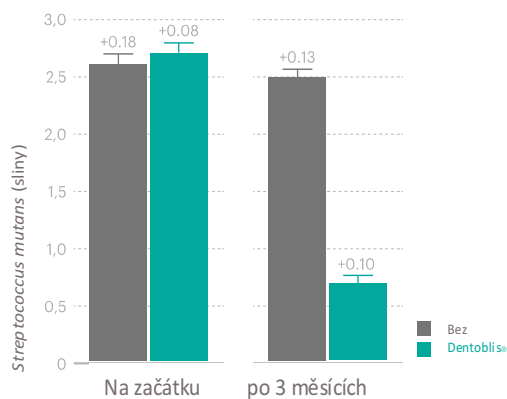


Klinické přínosy u dětí

Snížení patogenů

Bactodent

Dentoblis®



Zdroj: DiPierro 2015

favea +
pro vaši zdraví

Bactodent 3/2023

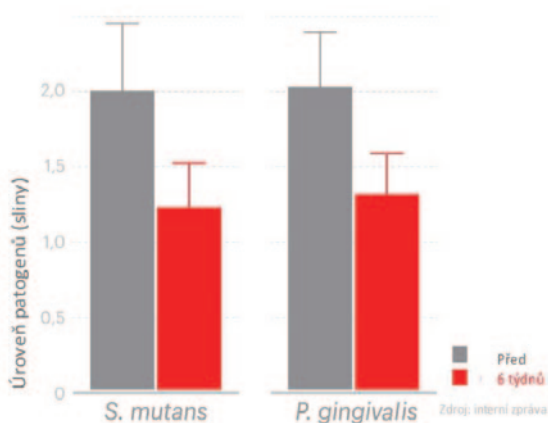
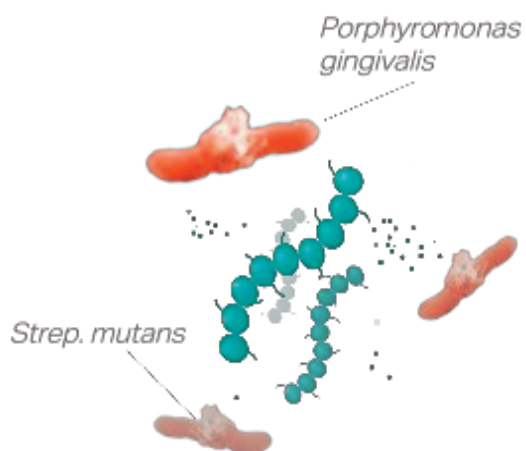
Klinické přínosy u dospělých

Snížení patogenů

Bactodent

Dentoblis®

Snížení klíčových patogenů
způsobujících zubní kaz a zánět dásní



Zdroj: interní zpráva

favea +
pro vaši zdraví

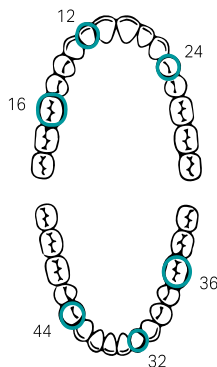
Bactodent 3/2023

Klinické přínosy u dospělých

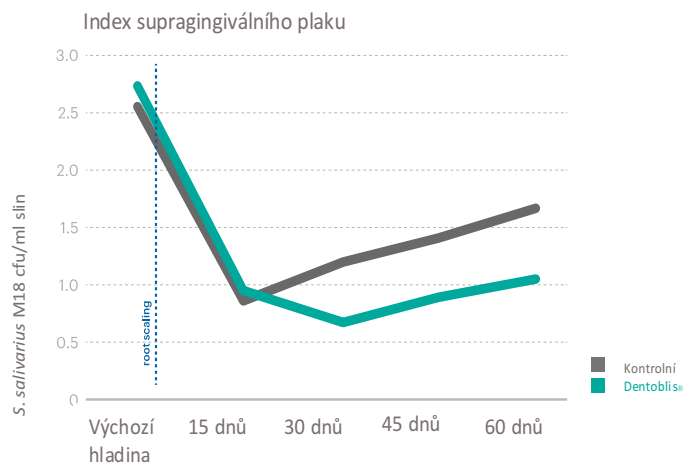
Redukce plaku

Zlepšení zánětu dásní po hlubokém odstranění zubního kamene a subgingivální kyretáži

↓ Index supragingiválního plaku (Loe & Silness)



Scariya et al. 2015



favea+

Bactodent 1/2023

Klinické přínosy u dospělých

Méně zánětů

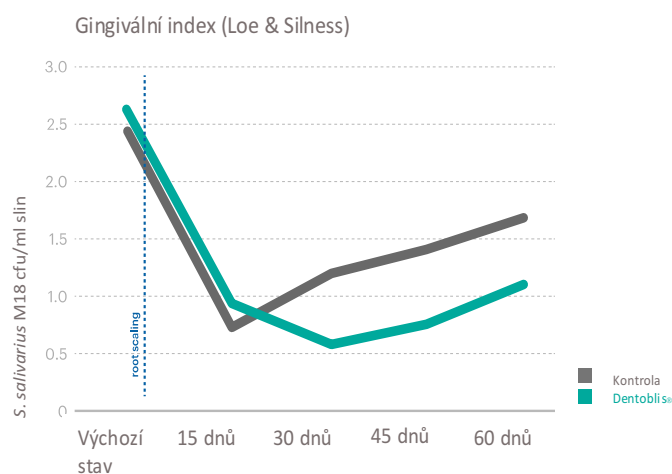
Zlepšení zánětu dásní po hlubokém odstranění zubního kamene a subgingivální kyretáži

↓ Index supragingiválního plaku (Loe & Silness)

- 0 = Normální dásně
- 1 = Mírný zánět
- 2 = Střední zánět
- 3 = Silný zánět



Scariya et al. 2015



favea+

Bactodent 1/2023

Klinické přínosy u dospělých

Méně zánětů

Zlepšení zánětu dásní po hloubkovém odstranění zubního kamene a subgingivální kyretáži

↓ Index supragingiválního plaku (Loe & Silness)

0 = žádné krvácení

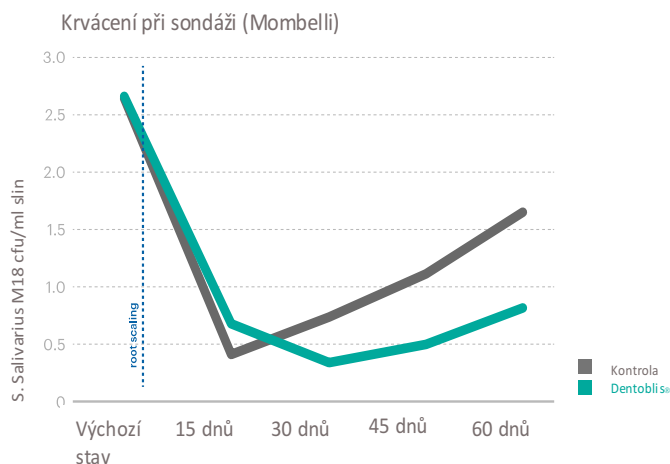
1 = ojedinělá krvácející místa

2 = krev tvoří spojitou červenou linii

3 = silné nebo hojné krvácení



Scariya et al. 2015



favea+

Bactodent 1/2023

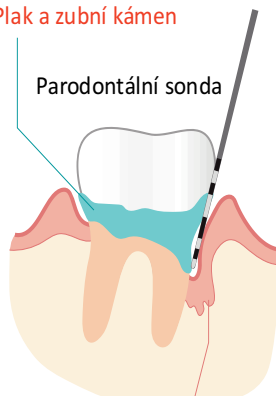
Klinické přínosy u dospělých

Redukce plaku

Zlepšení zánětu dásní po hloubkovém odstranění zubního kamene a subgingivální kyretáži

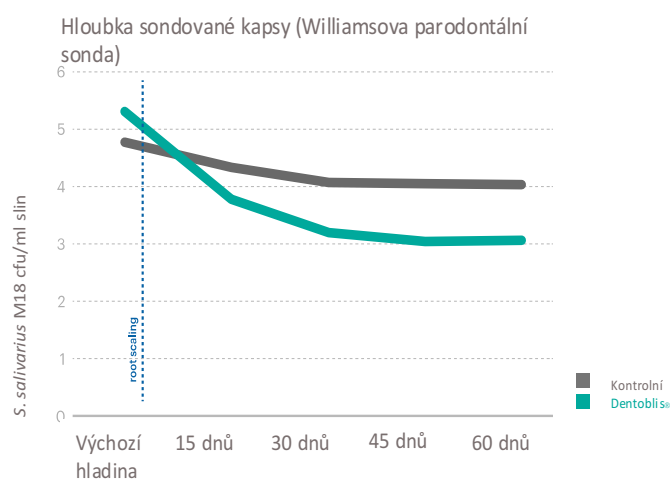
↓ Hloubka sondované kapsy (Williamsova parodontální sonda)

Plak a zubní kámen



Výskyt úbytku kosti

Scariya et al. 2015



favea+

Bactodent 3/2023

Zpráva zdravotnickým pracovníkům



Zubní lékař / hygienist(k)a	Pediatr	Lékárník
» Ústní péče » Obnovení zdravé ústní mikroflóry po zubním ošetření / subgingivální kyretáži » <i>Strep salivarius</i> = klíčová významná probiotická bakterie v ústní dutině » Klinicky testováno › Kolonizace dutiny ústní › Prevence zánětu dásní	» Prevence zubního kazu u dětí » Prevence zubního kazu » Redukce plaku » Snížení počtu bakterií zubního kazu » Klinicky testováno u dětí » Podávání pohodlné pro děti (pastilky)	» Ústní péče, zubní kaz a zánět dásní » Klinicky testováno » Vysoká akceptace a shoda
→ 14denní léčba	→ 3měsíční léčba	→ 14denní léčba → 3měsíční léčba



Bactodent 3/2023

Jak používat

Indikace

- > **Věková skupina: od 3 let**
- > **Pouze jedna pastilka denně po čištění zubů**
- > **Po čištění/ošetření zubů**
 - obnovuje zdravou ústní mikroflóru
 - doba: min. 14 dnů
- > **Po léčbě antibiotiky**
 - podpůrná terapie
 - doba: min. 14 dnů
- > **Pro denní ústní hygienu**
 - děti
 - na cestách



Bactodent 3/2023



Dentoblis®

Bactodent

Trojí účinek pro zdravé zuby a dásně: Potlačení růstu bakterií způsobujících zánět dásní, redukce plaku, neutralizace kyselosti.

Bakteriální nerovnováha

Bakterie žijící v ústní dutině
a ulpívající na zubech



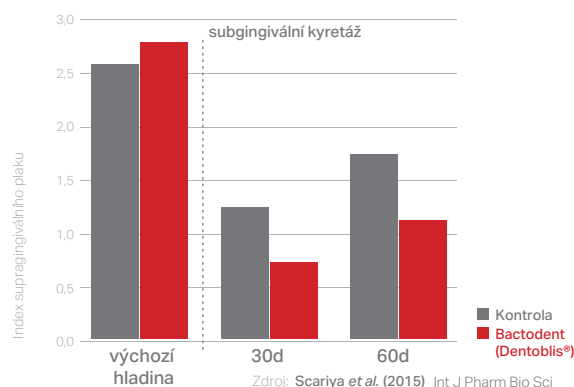
Zánět dásní
Bakterie, např.
Porphyromonas gingivalis,
vytváří zubní plak
a vyvolává zánět dásní

Zubní kaz

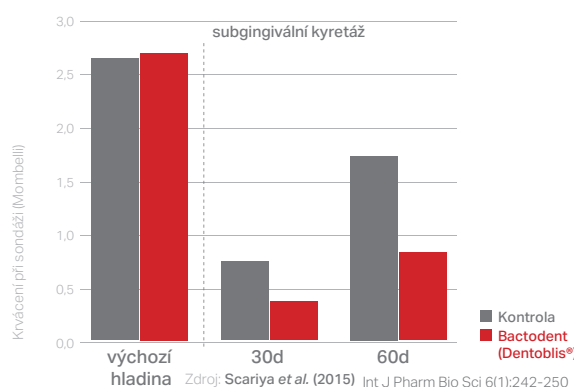
Bakterie, např. *Streptococcus mutans*,
produkující kyseliny z cukrů v potravě

- Obsahuje první zubní probiotický kmen na světě patentovaný pro zdraví zubů;
- chrání proti zánětu dásní, parodontóze a zubnímu kazu;
- snižuje krvácení dásní po hlubokém odstranění zubního kamene a subgingivální kyretáži;
- redukuje plak, potlačuje patogenní bakterie a neutralizuje kyselost;
- podporuje zdravou a ochrannou ústní mikroflóru;
- patentované složení produktu:
- pastilky s výborným přijetím u dětí i dospělých,
- s vitamínem D přispívajícím k udržení normálního stavu zubů;
- klinicky testováno u dětí a dospělých

Redukce plaku po hlubokém odstranění
zubního kamene a subgingivální kyretáži



Snižuje krvácení dásní po hlubokém odstranění zubního
kamene a subgingivální kyretáži;



Dentoblis®
VYROBENO PODLE SVYKASKEHO PATENTU

FAVEA+
testovaný

Bactodent

Streptococcus salivarius M18 **JAHODA**

+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY
+ PRO KRÁSNÉ A ZDRAVÉ ZUBY A DÁSNĚ

doplňek stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplněk pro dospělé a děti od 3 rokov

30 tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

Dentoblis®
VYROBENO PODLE SVYKASKEHO PATENTU

FAVEA+
testovaný

Bactodent

Streptococcus salivarius M18 **MÁTA**

+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY
+ PRO KRÁSNÉ A ZDRAVÉ ZUBY A DÁSNĚ

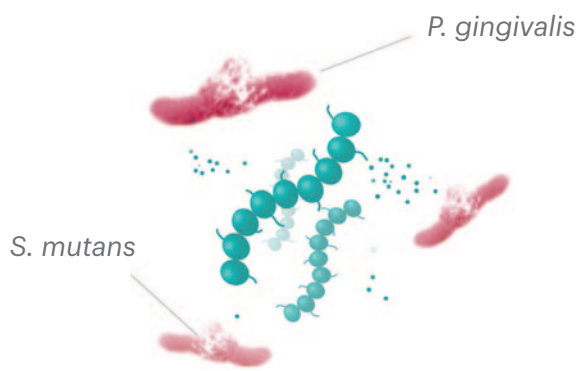
doplňek stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplněk pro dospělé a děti od 3 rokov

30 tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

FAKTA:

- obsahuje nejsilnější ochranná přírodní probiotika pro prostředí lidských úst¹
- účinně kolonizuje ústní dutinu²
- produkuje jedinečné antimikrobiální látky (např. Salivaricin M), které inhibují hlavní zubní patogeny (např. *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)¹³
- vykazuje enzymatickou aktivitu rozkládající plak (dextranáza) a neutralizující kyselost (ureáza)⁴
- snižuje výskyt plaku a klíčových patogenů způsobujících zubní kaz u dětí^{5,6}
- snižuje množství prozánětlivých cytokinů (IL-6 a IL-8)⁷
- snižuje výskyt klíčových patogenů způsobujících zubní kaz a zánět dásní u dospělých (např. *Streptococcus mutans* a *Porphyromonas gingivalis*)⁸
- snižuje zubní plak a zánět dásní u dospělých⁹



INDIKACE A POUŽITÍ:

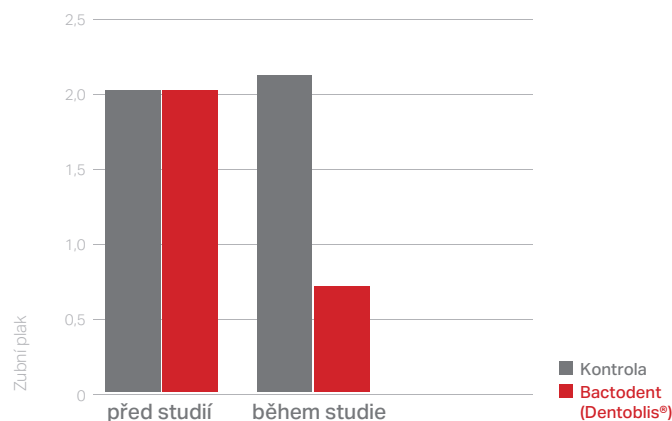
- ke snížení kazivosti zubů a zánětu dásní
- k obnovení zdravé a ochranné mikrobioty
- po profesionálním čištění zubů
- po užívání antibiotik
- jako každodenní ústní hygiena

JAK POUŽÍVAT:

- pro děti (od 3 let a dospělí)
- jednou denně
- po čištění zubů nechat pomalu rozpustit v ústech
- snížení zubního plaku u dětí

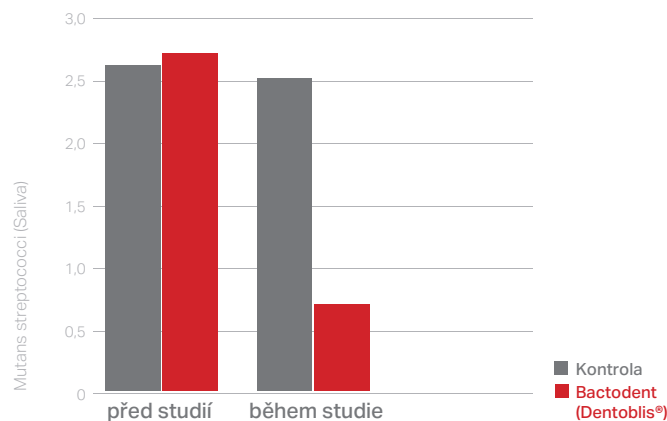
Literatura

1) Wescombe et al., Future Microbiol (2012), 2) Burton et al., Plos (2013), 3) Interní zpráva (2016a), 4) Heng et al., J Bacteriol (2011), 5) Burton et al., J Med Microbiol (2013), 6) Di Piero et al. Clin Cosmet Investig Dent (2015), 7) Adam et al., IADR/AADR/CADR 89th General Session and Exhibition (2011), 8) Interní zpráva (2016b), 9) Scariya et al., Int J Pharm Bio Sci (2015)



Zdroj: Di Piero et al. (2015)
Clin Cosmet Investig Dent 7:107-113

Snížení počtu bakterií zubního kazu u dětí



Zdroj: Di Piero et al. (2015)
Clin Cosmet Investig Dent 7:107-113

Trojité ochrana - MECHANISMUS ÚČINKU:

- **Dextranáza:**
 - odbourává zubní plak (dextran je jedním z hlavních polysacharidů zubního plaku)
- **Ureáza:**
 - neutralizuje kyselost
- **Antibakteriální aktivita:**
 - patogeny dásní a zubů



www.faveaplus.cz

favea+

Sekvence genomu orálního probiotika *Streptococcus salivarius*, kmen M18, produkujícího bakteriocin

Nicholas C. K. Heng,^{1*} Nurul S. Haji-Ishak,¹ Alaina Kalyan,¹ Andrew Y. C. Wong,¹ Marija Lovrić,¹ Joanna M. Bridson,¹ Julia Artamonova,¹ Jo-Ann L. Stanton,² Philip A. Wescombe,³ Jeremy P. Burton,³ Mary P. Cullinan,¹ and John R. Tagg^{3,4}

Sir John Walsh, Výzkumný institut, Fakulta zubního lékařství,¹ a Katedra anatomie,² Univerzita Otago, Dunedin, Nový Zéland; BLIS Technologies Ltd., Centrum pro inovace, Dunedin, Nový Zéland³; Katedra mikrobiologie a imunologie University Otago, Dunedin, Nový Zéland⁴

Obdrženo 12. srpna 2011/akceptováno 12. září 2011

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Nov. 2011, p. 6402–6403 | Vol. 193, No. 22

0021-9193/11/\$12.00 doi:10.1128/JB.06001-11

Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

***Streptococcus salivarius* je grampozitivní bakteriální komensální a průkopnický kolonizátor dutiny ústní u člověka. Mnoho kmenů produkuje ribozomálně syntetizovaná bílkovinná antibiotika (bakteriociny) a některé kmeny byly vyvinuty pro užívání v podobě orálních probiotik. Zde prezentujeme návrh sekvence genomu orálního probiotika produkujícího bakteriocin - *S. salivarius*, kmene M18.**

Grampozitivní bakterie *Streptococcus salivarius* je průkopnickým kolonizátorem dutiny ústní u člověka a rozsáhlé populace přetrvávají na tomto místě po celý život hostitele (12). *S. salivarius* je prototypový druh skupiny *S. salivarius*, která zahrnuje důležité mléčné druhy *Streptococcus thermophilus* (6). Mnoho kmenů *S. salivarius* produkuje ribozomálně syntetizovaná bílkovinná antibiotika (bakteriociny; recenzováno v odkazu 14), typicky kódovaná na nositeli megaplasmidu (10). Protože *S. salivarius* je obecně spojována s dobrým zdravotním stavem ústní dutiny, byly některé ověřené bezpečné bakteriocinogenické kmeny vyvinuty jako orální probiotika (2–4, 8, 12).

S. salivarius M18 (dříve kmen Mia) je orální probiotikum, nesoucí megaplasmid, které vykazuje širokospektrální inhibiční aktivitu proti některým streptokokálním patogenům, zejména *Streptococcus mutans* (10), který způsobuje kazivost zubů. Aby byla zajištěna genetická báze pro faktory vylepšující jeho probiotickou kandidaturu, např. repertoár bakteriocinu a geny vztahující se ke kolonizaci, a aby se dalo stanovit, zda kmen je bez virulence a determinantů resistance vůči antibiotikům, byl genom *S. salivarius* M18 sekvenován pomocí strategie brokovnice s celým genomem [Whole-Genom Shotgun] za použití pyrosekventoru Roche GS-FLX (7). Asembler Roche GS *de novo* (verze 1.1.03.24 a 2.3) sestavil přibližně 42.9 miliónu párů bází (~18-foldové krytí) do ~150 kontigů. Všechny domnělé chromosomální kontigy byly seřazeny relativně k sekvenci genomu *S. salivarius* CCHSS3 bez megaplasmidu (přístupové číslo u GenBank FR873481). Vyplnění mezery bylo dosaženo přímým sekvenováním na bázi Sangerovy metody PCR amplikonů generovaných se specifickými primery určenými pro kontig termini.

Vysoce kvalitní koncepce sekvence chromozomu *S. salivarius* M18 je v současné době tvořena pěti superkontigy (2,142,944 bp; obsah GC 39.6 %). Zbývající genomické mezery obsahují násobné kopie velkých (>6 - kb) genů kódujících domnělé vysoce repetitivní proteiny bohaté na serin a homologní se Hsa adhezínem *Streptococcus gordonii* (9). Ty výrazně absentují v *S. thermophilus* a mohou pomoci *S. salivarius* při kolonizaci povrchů ústní dutiny. Automatická anotace provedená rychlými anotacemi při použití technologie subsystémů (RAST) (1) a serverů Vedení automatické anotace prokaryo-

tického genomu NCBI [Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline] (PGAAP) odhalily 1,975 sekvencí kódujících protein (CDSs), šest rRNA operonů a 68 tRNA genů. Byla identifikována celá řada sekvencí inzercí s tím, že nejobvyklejší byly ISSag8 a IS1193. Kromě toho obsahuje chromosom locus (slm) specifikující produkci nového anti-*S. mutans* lantibiotického bakteriocinu označeného salivaricin M. Megaplasmid bakterie *S. salivarius* M18, pSsal-M18, je dlouhý 183,037 bp (obsah of 34.8%) a je prvním kompletně sekvenovaným streptokokálním megaplasmidem. Z 172 CDSs anotovaných prostřednictvím PGAAP jich 16 patří ke známým loci kódujícím bakteriocin pro salivariciny A2 (11), 9 (13) a MPS (5, 14). Je zajímavé, že existuje oblast několika otevřených čtecích rámců (ORF) (lemovaných sekvencemi inzercí), které jsou téměř identické s chromosomálními geny nalezenými v kmelech CCHSS3 and 57.I bakterie *S. salivarius* (přístupové číslo v GenBank CP002888) a které indikují genovou výměnu mezi chromozomem a megaplasmidem. Sekvence genomu bakterie *S. salivarius* M18 nebude užitečná jen pro komparativní genomiku, nýbrž je podstatná také pro rozvoj funkční genomické platformy, která usnadní molekulární evoluci a ekologická studia.

Přístupová čísla sekvence nukleotidů. Tento projekt „Whole-Genom Shotgun“ je uložen v DDBJ/EMBL/ GenBank pod přístupovým číslem AGBV00000000. Verze popsaná v tomto pojednání je první verzí, AGBV01000000.

Projekt sekvenování genomu M18 byl financován částečně z grantů Nadace pro lékařský výzkum Otago [Otago Medical Research Foundation - OMRF], Výzkumné nadace Asociace zubních lékařů Nového Zélandu [New Zealand Dental Association Research Foundation], a Rady pro loteriijní granty Nového Zélandu [New Zealand Lottery Grants Board]. N.S.H.-I., A.K., A.Y.C.W., M.L., a J.M.B. byli příjemci na Univerzitě Otago, Letní stipendium pro výzkum Fakulty zubního lékařství. J.A. byl badatelem Letního výzkumu OMRF.

* Dopisující autor. Poštovní adresa: Department of Oral Sciences, Faculty of Dentistry, University of Otago, P.O. Box 647, Dunedin 9054, New Zealand. Tel.: 64 3 479-9254. Fax: 64 3 479-7078. E-mail: nicholas.heng@otago.ac.nz.

REFERENCE

1. Aziz, R. K., a kol. 2008. Server RAST: rychlé anotace používající technologii subsystémů. BMC Genomics 9:75.
2. Burton, J. P. a kol. 2011. Posouzení bezpečnosti a tolerance orálního probiotika *Streptococcus salivarius* K12 u lidí: randomizovaná dvojité zaslepená studie kontrolovaná placebem. Food Chem. Toxicol. 49:2356–2364.
3. Burton, J. P., a kol. 2010. Rozšířená bezpečnostní data pro ústní probiotikum *Streptococcus salivarius* K12. Probiotics Antimicrob. Prot. 2:135–144.
4. Burton, J. P., a kol. 2006. Posudek na bezpečnost ústního probiotika *Streptococcus salivarius* K12. Appl. Environ. Microbiol. 72:3050–3053.
5. Dodd, S. J. 1999. Model slin k demonstraci produkce *Streptococcus salivarius* BLIS a charakterizaci salivaricinu MPS. Rigorózní práce. University of Otago, Dunedin, New Zealand.
6. Facklam, R. 2002. Co se stalo se streptokoky: přehled taxonomických a nomenklaturních změn. Clin. Microbiol. Rev. 15:613–630.
7. Heng, N. C. K., a J.-A. L. Stanton. 2010. Sekvenování orálního bakteriálního genomu s použitím vysokokapacitního sekvencování genomu Roche, systém FLX. Methods Mol. Biol. 666:197–218.
8. Tagg, J. R., a K. P. Dierksen. 2003. Léčba náhradou bakterií: adaptace 'bakteriologické války' na prevenci infekce. Trends Biotechnol. 21:217–223.
9. Takahashi, Y., a kol. 2002. Identifikace a charakterizace of hsa, genu kódujícího adhesin *Streptococcus gordonii* DL1, který váže kyselinu salivou. Infect. Immun. 70:1209–1218.
10. Wescombe, P. A., a kol. 2006. Megaplasmidy kódují rozlišující kombinace lantibiotik v bakterii *Streptococcus salivarius*. Antonie Van Leeuwenhoek 90:269–280.
11. Wescombe, P. A., a kol. 2006. Produkce lantibiotického salivaricinu A a jeho variant orálními streptokoky a použití specifického testu indukce ke zjištění jejich přítomnosti v lidských slinách. Appl. Environ. Microbiol. 72:1459–1466.
12. Wescombe, P. A., a kol. 2009. Streptokokální bakteriociny a případ pro *Streptococcus salivarius* jako model orálním probiotik. Future Microbiol. 4:819–835.
13. Wescombe, P. A., a kol. 2011. Salivaricin 9, nové lantibiotikum produkované bakterií *Streptococcus salivarius*. Microbiology 157:1290–1299.
14. Wescombe, P. A., N. C. K. Heng, J. P. Burton a J. R. Tagg. 2010. Něco starého a něco nového: aktualizace ohromujícího repertoáru bakteriocinu produkovaného bakterií *Streptococcus salivarius*. Probiotics Antimicrob. Prot. 2:37–45.

Downloaded from <http://jb.asm.org/> on May 4, 2015 by UNIV OF SYDNEY

NOVINKA V NAŠEM SORTIMENTU

BACTORAL NEO

bez cukru - šetrný k zubům

Bactoblis®
VYROBENO PODLE ŠVÝCARSKÉHO PATENTU

favea+

Bactoral^{NEO}

Streptococcus salivarius K12

+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY
+ PRO ZDRAVÉ ZUBY

doplněk stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplněk pro dospělé a děti od 3 roků



30

tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech



ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

Výstup Cariogramu po 90 dní orální léčby pomocí *Streptococcus salivarius* M18 u dětí s vysokým rizikem zubního kazu: výsledky randomizované kontrolované studie

Francesco Di Piero¹, Alberto Zanvit², Piero Nobili², Paolo Risso³, Carlo Fornaini⁴

¹Katedra přírodních věd, výzkum Velleja, ²Stomatologický ústav, Milano, Itálie, ³Katedra zdravotní péče, Univerzita v Janově, Itálie;

⁴Laboratoř Teleo, Fakulta zubního lékařství, Univerzita v Nice, Nice, Francie

Tento článek byl publikován v tomto odborném periodiku vydavatelství DovePress:

Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry

3. října 2015

Zubní kaz je nejčastějším chronickým onemocněním u dětí. Cariogram je uznávaný počítačový software pracující na bázi algoritmů. Zakládá se na různých rizikových faktorech vztahujících se ke kazům a je určen pro klinické lékaře, jež podporuje v provádění objektivnějších a více konzistentních hodnocení rizika zubního kazu. Tento typ přístupu předchází diagnóze zubního kazu a umožňuje dentistům identifikovat ohrožené pacienty a pak přijmout vhodná preventivní opatření ještě dříve, než se kaz dále rozvine. Jedním z etiologických faktorů, který je příznivý pro rozvoj zubních kazů, je bakterie *Streptococcus mutans*. Proti těmto acidogenním obyvatelům zubního plaku lze účinně působit aktivitou bakteriocinů, jež uvolňuje probiotická kultura *Streptococcus salivarius* M18 (*salivarius* M18). Kromě toho *salivarius* M18, poté co osídlí sliznici ústní dutiny člověka, produkuje enzymy dextranázu a ureázu, které jsou schopny potírat vytváření plaku a kyselost slin. Náhodně bylo vybráno šedesát šest subjektů vysoce ohrožených zubním kazem a pak po dobu 90 dní buď ošetřováno, nebo neošetřováno ústním přípravkem s obsahem ústního probiotika *salivarius* M18 (*Carioblis*®). Výsledky indikují, že použití probiotika *salivarius* M18 zvyšuje šanci předcházet novým zubním kazům u dětí a jeho aplikaci lze navrhnout jako nový nástroj ve vybavení dentistů, který může být použit u subjektů považovaných za vysoce ohrožené zubním kazem na základě jejich výstupu Cariogramu.

Klíčová slova: BLIS M18, predikce zubního kazu, dextranáza, ureáza, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, plak, pH slin, bakteriociny

Úvod

Zubní kaz je nejobvyklejším chronickým onemocněním u dětí, které se stále více šíří v mnoha světových populacích.^{1,2} Jde o multifaktoriální onemocnění, které je zejména způsobeno interakcemi mezi bakteriemi *Streptococcus mutans*, zejména *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*, a individuálními rizikovými faktory pro vznik zubního kazu, jako jsou složení slin, expozice fluoridům a stravovací návyky.³ Bez ohledu na to, že zubnímu kazu lze předcházet a bez ohledu na mnoho významných technologických zlepšení v oboru zubního lékařství v posledních letech⁴ zůstává kazivost zubů velmi difúzním a neřešeným medicínským problémem. Protože jde o patologii udržovanou patogenními mikroby, léčba využívající konvenční antibiotika účinná proti streptokokům může být účinná pouze krátkodobě k tomu, aby snížila hladinu dentálního plaku a počet bakterií *Streptococcus mutans*.

Nicméně protože většina antibiotik vykazuje relativně širokospektrální účinnost, bez rozlišení ničí jak komenzální, tak i potenciálně škodlivé bakterie, a tím vytvářejí nevyváženost v mikroflóře.⁵ Tento výstup by mohl být následkem používání dobře známých přírodních nebo syntetických antibiotik a také používání nových léčiv na bázi bylinek, vybavených antibiotickou aktivitou.^{6,7} Nyní se stává zřejmým, že závažnost některých ústních patologií včetně kazivosti zubů, zánětu středního ucha, zápachu z úst a streptokokální faryngotonsilitidy lze vztáhnout na rozvoj nerovnováhy ústní mikroflóry. Aplikace orálních probiotik s cílem pomoci obnovit rovnováhu mikroflóry a tím zlepšit zdravotní stav ústní dutiny je relativně nový koncept.⁸ Některé domnělé komenzální bakterie

jsou hodnoceny pro jejich schopnost podporovat prevenci zubního kazu. Některé počáteční studie, které se zakládaly na používání intestinálních probiotik, hovořily o snížení hladin *S. mutans* a zjevně nižšímu počtu zubních kazů.^{9,10} Nicméně, protože tyto kmeny mají své meze, co se týče jejich osídlení tkání ústní dutiny, byla docela nedávno vyvinuta nová generace probiotických kmenů, které pocházejí z lidské ústní dutiny a které patří ke komenzálním kmenům, o nichž je známo, že mají extrémně nízký patogenní potenciál. V tomto ohledu je klíčovým druhem *Streptococcus salivarius* a nejzřejměji bylo zkoumáno orální probiotikum identifikované jako kmen K12. Toto probiotikum bylo zkoumáno co do jeho produkce bakteriocinu, kolonizace ústní dutiny, persistence v ústní dutině a také co do jeho účinnosti v potírání zápachu z úst, orální kandidózy, faryngotonsilitidy a akutního zánětu středního ucha.^{11–22} *Streptococcus salivarius* M18 (*salivarius* M18) (klasifikace IDA: DSM 14865), 23 kmen původně izolovaný ze zdravé dospělé ženy během specifického vyhledávání orálního komenzálního kmene, který by byl schopen blokovat bakterie *Streptococcus mutans*, následně ukázal, že má relativně široké spektrum činnosti inhibiční látky, která je podobná bakteriocinu (BLIS), proti *S. mutans* a *S. sobrinus* a že produkuje enzymy dextranázu i ureázu, jejich aktivita by potenciálně mohla pomoci omezit progresi zubního kazu tím, že zredukuje akumulaci a acidifikaci zubního plaku.^{24–26} Celý genom kmene *salivarius* M18 byl publikován nedávno a jeho repertoár bakteriocinů zahrnuje megaplasmidem kódovaný salivaricin A2, salivaricin MPS, salivaricin 9 a chromozomálně kódovaný salivaricin M.^{23,24,27} Nedávné pokusy odhalily, vedle bezpečnosti a snášenlivosti, schopnost kmene *saliva-*

rius M18 osídlovat ústní dutinu člověka a přetrvávat v ní,²⁸ snižovat vytváření plaku, redukovat počet bakterií *S. mutans* usídlených v dutině ústní u dětí mladšího školního věku²⁹ a snižovat mírnou i těžkou gingivitidu a periodontitidu u dospělých.³⁰ Na základě těchto biochemických, mikrobiologických a klinických nálezů určujeme, zda orální a každodenní užívání kmene *salivarius* M18 ovlivňuje nebo modifikuje výstup Cariogramu po 90 dnech léčby u dětí s vysokým rizikem vzniku nových zubních kazů. Cariogram je software na bázi algoritmu, který byl vyvinut ve Švédsku v roce 1997 na Univerzitě v Malmö, na základě devíti rozdílných rizikových faktorů vztahujících se k zubnímu kazu, spolu s úsudkem lékaře, a je určen pro klinické lékaře pro provádění objektivnějších a více konzistentních hodnocení rizika zubního kazu.³¹ Efektivita programu se potvrdila u dětí předškolního věku, dětí školního věku, mladistvých a dospělých jedinců.^{32–38}

Materiály a metody

Subjekty a kritéria

Do této randomizované kontrolované studie bylo zahrnuto sedmdesát šest dětí (ve věku 6–17 let), jejichž rodiče se studií udělili informovaný souhlas a které byly klasifikovány jako vysoce ohrožené na základě výsledku Cariogramu provedeného v den 0 (šance předejít novým zubním kazům < 25). Kritériem pro vyloučení byla diagnóza srdeční, respirační, renální, jaterní a intestinální choroby nebo probíhající léčba antibiotiky a/nebo kortikosteroidy z důvodů prevence/léčby opakujících se bakteriálních patologií, jako je cystitida, faryngotonsilitida či akutní zánět středního ucha, nebo k potření alergických reakcí a/nebo astmatu. Podle protokolu bylo povoleno příležitostné užívání acetaminofenu nebo ibuprofenu ke zvládnutí horečky a/nebo bolesti a antibiotik předepsaných lékařem. Při užívání antibiotik byly ošetřované děti požádány, aby přestaly užívat produkt na bázi *salivarius* M18. Protože nedošlo k výpadkům, všech 76 dětí (38 dětí v ošetřované skupině a 38 dětí v kontrolní neošetřované skupině) podstoupilo následující vyšetření provedené po 90 dnech a bylo zahrnuto do statistické analýzy.

Schéma studie

Tato randomizovaná kontrolovaná byla prováděna v oblasti rutinní klinické praxe v oblasti města Milán (Itálie) v době od března do září 2014 a v souladu s kritérii stanovenými Helsinskou deklarací. Studii schválila Etická rada města Milán. Rodiče

všech dětí zúčastněných ve studii byli o metodách pokusu informováni a podepsali souhlas a dokumenty týkající se ochrany soukromí, čímž udělili souhlas s publikací výsledků. Jak je zobrazeno na Obr. 1, ze sta analyzovaných dětí jich bylo sedmdesát šest považováno za způsobilé k začlenění; tyto děti byly náhodně rozděleny tak, že po dobu tří měsíců užívaly jednou denně testovaný produkt (ošetřovaná skupina; n=38), nebo nedostávaly žádnou léčbu (kontrolní skupina; n=38). Randomizace byla provedena za použití metody zalepené obálky. Po 90 dnech sedmdesát šest dětí přišlo na následné vyšetření a postoupilo svůj druhý test dle Cariogramu. Za dobu trvání studie byli všichni začlenění jedinci každých 15 dní v kontaktu se zubními lékaři, kteří byli odpovědní za to, aby v rámci studie podávali zprávu o jejich zdravotním stavu a parametrech studie, jako je snášenlivost probiotik a dodržování dávkování, a aby umožnili dokumentaci výskytu jakýchkoliv vedlejších účinků, které by se případně mohly k léčbě vztahovat. Subjektům byl rovněž umožněn každodenní přístup k lékařům odpovědným za studii.

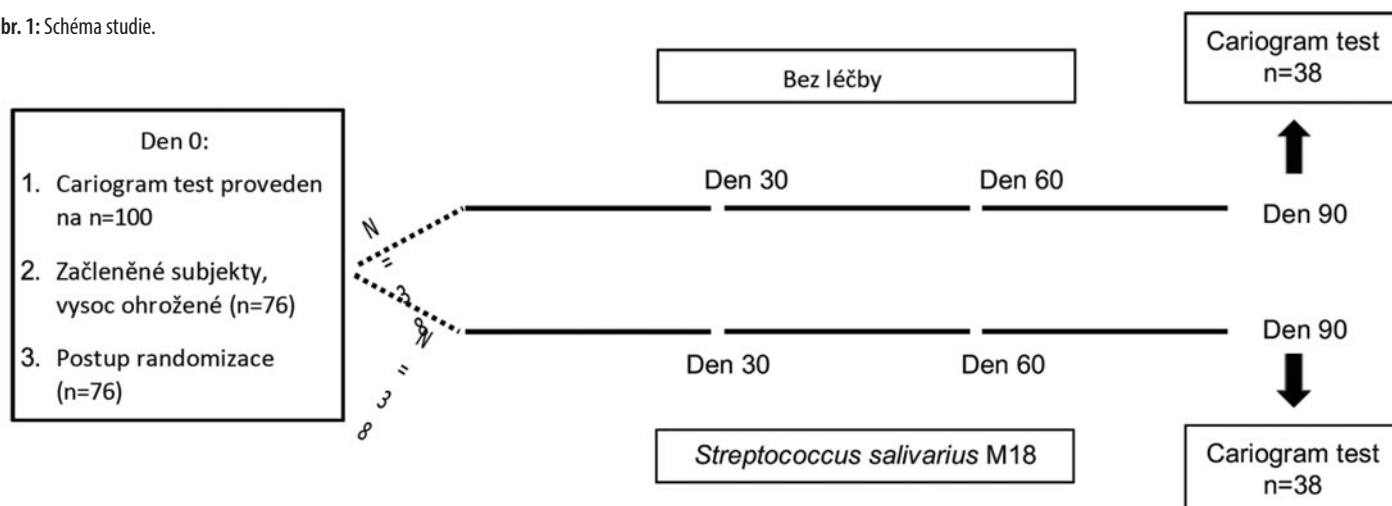
Testovaný produkt

Salivarius M18 (klasifikace IDA: DSM 14865), který výrobce rovněž nazývá BLIS M18 (BLIS Technologies, Dunedin, Nový Zéland), byl společností SIIT (Trezano S/N, Itálie) vyroben jako pomalu rozpustné orální tablety a italské ministerstvo zdravotnictví jej dne 19. července 2013 (číslo registrace 69163) zaregistrovalo jako doplněk stravy Carioblis® firmy Omeopiacenza (Pontenure, Itálie), a to podle ustanovení zákona č. 169 z roku 2004. Preparát Carioblis® používaný v našem výzkumu obsahoval minimálně 1 miliardu koloniformních jednotek (CFU)/ tabletu kmene *salivarius* M18.

Protokol o léčbě

Počínaje dnem 0 po den 90 byla každému subjektu každý večer těsně před spaním podána jedna tableta preparátu Carioblis®. Tableta se měla nechat pomalu rozpustit v dutině ústní bez kousání či polknutí. Ve večerních hodinách se typicky snižuje množství slin a to zlepšuje účinnost kolonizace v dutině ústní. Pouze na samém začátku léčby byla před podáním tablety, asi 30 minut, použita ústní voda na bázi chlorhexidinu (0.2%). Tento postup zlepšuje účinnost orální kolonizace ze strany BLIS M18 tím, že v tkáni ústní dutiny vytváří niky se spotřebovanými bakteriemi. Aby bylo možno posoudit, jak se subjekt drží vyhotoveného protokolu, byly subjekty požádány, aby vracely nepoužité krabičky a tablety.

Obr. 1: Schéma studie.



Za akceptovatelné dodržování se považovalo podání alespoň 95% přidělených tablet.

Mutans, sliny a plak

K vyhodnocení přítomnosti *S. mutans* byl použit test GC Saliva-Check Mutans (monoklonální na bázi protilátek). Pokud se týká slin, k posouzení pH a množství byl použit test GC Saliva-Check Buffer. Aby mohly být získány vzorky slin k analýze bakterií ze skupiny *Streptococcus mutans* a zjištěna míra sekrece slin (mL/min) a obranná schopnost, byly všem dětem odebrány sliny stimulované parafinem. Přítomnost zubního plaku byla vyhodnocena pomocí testu GC Plaque Indicator (indikátor zubního plaku). Všechny sady dodává společnost GC Europe, Leuven, Belgie.

Cíle studie

Zásadními cíli pro studii byly 1) stanovit profily bezpečnosti a snášenlivosti produktu na bázi *salivarius* M18 u dětí s vysokým rizikem vzniku nového zubního kazu a 2) u týchž dětí posoudit, zda se po 90 dnech léčby produktem na bázi *salivarius* M18 objevily nějaké modifikace Cariogramu.

Statistická analýza

Abychom mohli zkoumat nulovou hypotézu nulového účinku léčby preparátem Carioblis® pro každý klinický parametr a pro globální souhrn, aplikovali jsme dvouvýběrový Wilcoxonův test pro páry s označenými pozicemi. Abychom mohli zkoumat účinek terapie preparátem Carioblis® na bilanci Cariogramu při použití průměrovaných klinických parametrů, použili jsme dvouvýběrový Fischerův exaktní test. Byl použit statistický software JMP® 10 pro Mac OS X (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) a práh pro statistickou významnost byl 95%. Abychom mohli vypočítat riziko kazu u skupiny subjektů (výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1 a na Obrázku 2), použili jsme průměrnou hodnotu každé jednotlivé položky Cariogramu a považovali ji za rovnou 0, pokud desetinné hodnoty byly mezi 0.1 a 0.4, a rovnou 1, pokud desetinné hodnoty byly mezi 0.5 a 0.9. Software Cariogram používal verzi Java Internet 2004.

Tabulka 1: Hodnoty Cariogramu (v den 0 a den 90) vypočtené za pomoci průměrné hodnoty položek na seznamu

Léčba, doba	Aktuální šance zabránit novým kazům (%)	Strava (%)	Bakterie (%)	Náchylnost (%)	Okolnosti (%)
Salivarius M18, den 0	20	17	29	23	11
Salivarius M18*, den 90	70	7	7	9	7
Neléčení, den 0	20	17	29	23	11
Neléčení, den 90	37	11	26	16	10

Poznámka:

*Veškeré hodnoty M18, den 90, jsou signifikantní ($P < 0.01$) versus léčba M18, den 0.

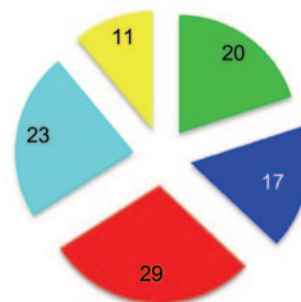
Zkratka: *Salivarius* M18, *Streptococcus salivarius* M18.

Výsledky

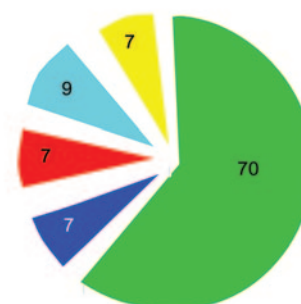
Tato randomizovaná a kontrolovaná studie byla provedena na 76 dětech vysoce ohrožených vznikem nových zubních kazů. Třicet osm těchto subjektů bylo po dobu 90 dní léčeno preparátem Carioblis® (výrobek na bázi *S. salivarius* M18) a ostatní sloužily jako kontrolní vzorek (neléčená skupina). Nedošlo k žádnému výpadku, proto všechny děti byly považovány způsobilé pro statistickou analýzu. Jak je ukázáno

Obr. 2: Grafické znázornění hodnot Cariogramu (%) vypočtených pomocí průměrných hodnot položek na seznamu. Zkratka: *Salivarius* M18, *Streptococcus salivarius* M18.

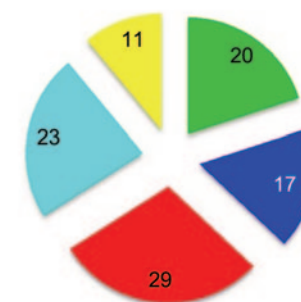
Salivarius M18, léčená skupina (den 0)



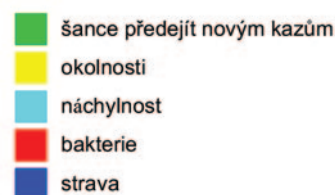
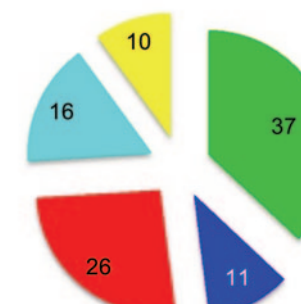
Salivarius M18 léčená skupina (den 90)



Neléčená skupina (den 0)



Neléčená skupina (den 90)



Tabulka 2: Charakteristika* začleněných dětí		
Léčba, doba	Salivarius M18 - léčená skupina (n=38)	Neléčená skupina (n=38)
Chlapci, n	25	21
Věk chlapců	11.2±3.2	12.7±2.9
Dívky, n	13	17
Věk dívek	11.5±3.6	11.8±3.8
Poznámka: *Nesignifikantní rozdíly mezi skupinami; věk vyjádřen v letech 9 standardní odchylka. Zkratka: Salivarius M18, Streptococcus salivarius M18.		

Tabulka 3: Obecný výstup Cariogramu v den 0 a den 90		
	Salivarius M18 - léčená skupina (n=38)	Neléčená skupina (n=38)
Den 0**	15.9±2.6 (16)	16.3±2.9 (16)
Den 90**	11.1±2.0 (11)*	14.4±3.2 (14)
⊗ % vs den 0	30.2	11.7
Poznámka: *P<0.01 vs den 0; **data vyjádřena jako střed ± standardní odchylka (medián). Zkratka: Salivarius M18, Streptococcus salivarius M18.		

Tabulka 4: Cariogram: výstup jednotlivých parametrů ve skupině léčené preparátem salivarius M18 (n=38)			
	Den 0*	Den 90*	P
Zkušenost s kazivostí	2.7±0.5 (3)	2.7±0.5 (3)	ns
Související onemocnění	0.0±0.2 (0)	0.1±0.2 (0)	ns
Stravování, obsah	1.9±1.0 (2)	1.4±0.7 (1)	~ 0.05
Stravování, frekvence	1.4±0.8 (1)	1.2±0.5 (1)	~ 0.05
Objem plaku	2.0±0.8 (2)	1.0±0.6 (1)	~ 0.01
Mutans streptococci	2.7±0.5 (3)	0.7±0.8 (0)	~ 0.01
Fluoridový program	2.4±0.7 (2)	1.8±0.5 (2)	~ 0.01
Sekrece slin	1.7±0.9 (2)	1.2±1.1 (1)	~ 0.05
Obranná kapacita	0.0±0.2 (0)	0.0±0.0 (0)	~ 0.05
Klinické posouzení	1.1±0.4 (1)	1.0±0.2 (1)	ns
Poznámka: *Data vyjádřena jako střed ± standardní odchylka (medián). Zkratka: ns, nesignifikantní, Salivarius M18, Streptococcus salivarius M18.			

v Tab. 2, mezi těmito dvěma skupinami neexistovaly v oblasti pohlaví a věku žádné rozdíly. 90 dní léčby kmenem M18 generovalo u léčené skupiny statisticky významné snížení, o více než 30 %, u celkového výstupu Cariogramu. U kontrolní skupiny nebyl pozorován statistický rozdíl (Tab. 3). Při analýze každého individuálního parametru výsledků Cariogramu ve skupině léčené preparátem salivarius M18 (Tab. 4) lze pozorovat, že jsou zlepšeny všechny parametry s výjimkou „zkušenost s kazivostí“, „související onemocnění“, a „klinický posudek“. Některá zlepšení lze pravděpodobně připsat lepší kontrole stravy (obsah a frekvence stravování) nebo změnám v ústní hygieně a/nebo profylaxi (fluoridový program) a nelze je jasným důkazem spojit s léčbou. Jiná, jako „objem plaku“, „bakterie skupiny Streptococcus mutans“, a „obránná schopnost“, by mohla být přímým důsledkem léčby, protože salivarius M18 uvolňuje bakteriociny schopné zabít bakterie skupiny Streptococcus mutans a enzymy dextranázu a ureázu, které jsou schopny potírat vytváření plaku a zvyšovat pH slin. Pozoruhodné je, že

„kontrola plaku“ a „bakterie skupiny Streptococcus mutans“ byly redukovány o 50 %, případně 75 %. Naopak, jak je uvedeno v Tab. 5, neléčená skupina nevykazovala stejný typ zlepšení a jediné statisticky významné změny byly způsobeny lepší kontrolou stravy, ústní hygienou a profylaktickým přístupem. Software Cariogramu byl jedinečně implementován, aby vypočetl riziko zubního kazu u jednotlivých subjektů. Nicméně jsme využili algoritmu Cariogramu a použili průměrnou hodnotu každé jednotlivé položky Cariogramu, abychom vypočetli riziko kazu u skupiny subjektů. Tento nevalidovaný postup umožňuje konstrukci obrazu pravděpodobného dopadu, který léčba může mít na skupinu pacientů. Jak je ukázáno v Tab. 1 a na Obr. 2, léčba produktem na bázi kmene M18 podstatným způsobem zlepšuje „šanci na zabránění vzniku nových zubních kazů“ z 20 na 70, snižuje parametr „bakterie“ z 29 na 7 a snižuje „náchyllost“ z 23 na 9. U neléčené skupiny nebyly evidentní žádné relevantní varianty. Nakonec, v Tab. 6, léčba na bázi M18 ukázala velmi dobrý profil bezpečnosti bez vedlejších účinků souvisejících s léčbou a žádný výpadek subjektů. Snášenlivost byla hodnocena jako „dobrá“ a „velmi dobrá“ u třiceti pěti z třiceti osmi subjektů a v souvislosti s dodržením podmínek bylo dosaženo překrývajících se výsledků.

Tabulka 5: Cariogram: výstup jednotlivých parametrů ve skupině neléčené preparátem salivarius M18 (n=38)			
	Den 0*	Den 90*	P
Zkušenost s kazivostí	2.8±0.5 (3)	2.890.6 (3)	ns
Související onemocnění	0.190.2 (0)	0.290.2 (0)	ns
Stravování, obsah	2.091.0 (2)	1.390.4 (1)	~ 0.01
Stravování, frekvence	1.390.8 (1)	1.190.7 (1)	~ 0.05
Objem plaku	2.090.9 (2)	2.190.7 (2)	ns
Mutans streptococci	2.690.5 (3)	2.590.6 (3)	ns
Fluoridový program	2.390.7 (2)	1.690.7 (1)	~ 0.01
Sekrece slin	1.890.9 (2)	1.491.2 (1)	~ 0.05
Obranná kapacita	0.290.2 (0)	0.290.2 (0)	ns
Klinické posouzení	1.290.4 (1)	1.290.1 (1)	ns
Poznámka: *Data vyjádřena jako střed ± standardní odchylka (medián). Zkratka: ns, nesignifikantní, Salivarius M18, Streptococcus salivarius M18.			

Tabulka 6: Snášenlivost, shoda a vedlejší účinky u dětí (n=38) léčených orálně po dobu 90 dní preparátem Streptococcus salivarius M18, jak o tom informovaly děti a/nebo jejich rodiče a stanovili dentisté odpovědní za studii.			
	Snášenlivost	Shoda	Vedlejší účinky
Velmi dobré	n=30	n=32	Žádné
Dobré	n=5	n=6	Žádné
Přijatelné	n=3	n=0	Žádné
Nepřijatelné	n=0	n=0	Žádné

Diskuse

Vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu je důležitým nástrojem, který pomůže dentistům lépe pochopit profil pacienta. Klinicky se prokázalo, že software Cariogram je při vyhodnocení takového rizika účinný.³⁹ Cariogram se, kromě profesionálního úsudku odborného dentisty, zakládá na souboru

devíti patologických a ochranných faktorů. Z těchto faktorů je v predikci rizika vzniku zubního kazu pravděpodobně nejrelevantnější „zkušenost s kazivostí“ a vlastně byl prokázán silný vztah mezi zkušeností s kazivostí a profilem rizika vzniku kazu.^{40,41} Nezdá se, že by mikrobiální testy zaměřené na posouzení přítomnosti bakterií skupiny *Streptococcus mutans* byly stejně relevantní. To by mohlo být způsobeno tím, že za přítomnosti fluoridu a spolu s vhodnou stravou co do množství a kvality může být tolerován vysoký počet bakterií skupiny *Streptococcus mutans*, aniž by zavinily podstatné poškození zubů.⁴² Fluorid není jediným potenciálně ochranným faktorem v přítomnosti velkého množství škodlivých streptokoků. V ústní mikroflóře mohou být populace bakterií skupiny *Streptococcus mutans* vyváženy přítomností bakterií působících proti nim. Má se za to, že zejména důležitou úlohu mezi nimi hraje *S. salivarius*, jedna z nejvíce převládajících komenzálních ústních bakterií. Ukázalo se, že různé kmeny bakterií *S. salivarius* jsou schopny působit proti růstu bakterií skupiny *Streptococcus mutans*⁸ a z nich nejsilnější klinický potenciál projevil kmen M18.^{29,30} Na tomto základě jsme se rozhodli otestovat schopnost *salivarius* M18 modifikovat výstup Cariogramu. Podle našich výsledků 90 dní léčby tímto orálním probiotikem zvýšilo šance předcházet vzniku nových zubních kazů u dětí. Tento výstup se dá připsat specifické protikazové charakteristice kmene M18, který je po kolonizaci ústní sliznice schopen uvolňovat bakteriociny, které omezují růst *S. mutans* a *S. sobrinus*, a enzymy dextranázu a ureázu, které jsou katalyzátorem rozpadu dextranu (napomáhajícího rozpustnosti plaku), a hydrolýzu ury (zvyšující pH slin). Předkládaná studie obsahuje některé odchylky: 1) není to zaslepená studie; 2) neexistuje skupina užívající placebo; 3) kontrolní skupinu tvoří neléčené subjekty; a 4) počet začleněných subjektů je poněkud nízký. Nicméně tato studie představuje jeden z pionýrských pokusů analyzovat významnost kmene *salivarius* M18 v dentální praxi. Pokud bude možno tyto předběžné výsledky potvrdit větším počtem subjektů a za dvojité zaslepených klinických podmínek, bude možné v budoucnu navrhnout praktickou aplikaci kmene M18 jako nového nástroje ve vybavení dentistů, a to spolu s již dostupnými strategiemi (např. protikazová strava, fluorid a ústní hygiena), které mohou být přijaty pro subjekty považované na základě jejich Cariogramu za vysoce rizikové. Na základě vypočteného rizika vzniku nového zubního kazu jsou subjekty rozděleny do tří skupin: nízké, střední a vysoké. V závislosti na těchto skupinách jsou v různém rozsahu aplikovány základní aspekty primární prevence: lehké u skupiny s nízkým rizikem, mírné u skupiny se středním rizikem a důkladné a násobné u jednotlivců s vysokým rizikem. Samozřejmě v případě pacientů zařazených do vysoce rizikové skupiny, ale možná také u těch, kteří patří do skupiny vystavené střednímu riziku, by mohlo být rozhodující přidání protokolu zahrnujícího podání *salivarius* M18, a to k dalšímu snížení rizika receptivity pro kazivost zubů. Riziko vzniku zubního kazu se konfiguruje jako predispozice jednotlivce k tomu, aby byl postižen kazovou patologií bez ohledu na přítomnost kazu v době prohlídky u zubního lékaře. Tento typ diagnózy pak předchází diagnóze kazu, umožňuje dentistovi zachytit ohroženého pacienta a přijmout příslušná preventivní opatření k zachycení rozvoje kazivosti zubů.

Poděkování

Autoři děkují dr. J. Taggovi za návrhy a recenzi studie.

Zveřejnění

F Di Pierro je ředitelem pro výzkum u společnosti Velleja Research, která vyvinula finální výrobek testovaný v této studii. Ostatní autoři informují o tom, že v této práci neexistují žádné další střety zájmů.

Reference

1. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. Globální nárůst zubních kazů Hrozící krize veřejného zdraví. *Am J Dent.* 2009;22:3–8.
2. Vachirarojpisan T, Shinada K, Kawaguchi Y, Laungwechakan P, Somkote T, Detsomboonrat P. Zubní kaz u dětí raného věku mezi 6 a 19 měsíci. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32(2): 133–142.
3. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Zubní kazy. *Lancet.* 2007;369: 51–59.
4. Shah N, Bansal N, Logani A.: Poslední pokroky v oblasti zobrazovacích technik v zubním lékařství. *World J Radiol.* 2014; 6(10):794–807.
5. ten Cate JM, Zaura E. Četné mikrobiální druhy v orálních biofilmech: jak by mohla být antibakteriální terapie účinná? *Adv Dent Res.* 2012;24(2):108–111.
6. Silva JP, Castilho AL, Saraceni CH, DÍaz IE, Paciencia ML, Sufredini IB. Antistreptokokální aktivita extraktů z rostlin z brazilských amazonských deštných pralesů ukazuje potenciál pro preventivní strategie v oblasti kazubního kazu. *J Appl Oral Sci.* 2014;22(2):91–97.
7. Brighenti FL, Salvador MJ, Delbem AC, a kol. Systematický screening extraktů z rostlin z brazilského Pantanalu s antimikrobiální aktivitou proti bakteriím s kariogenní relevancí. *Caries Res.* 2014;48(5):353–360.
8. Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. Využití orálních probiotik z *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol.* 2012;7(12): 1355–1371.
9. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Účinek jogurtu s *Bifidobacterium* DN-173 010 na bakterie skupiny *Streptococcus mutans* a laktobacily ve slinách u mladistvých. *Acta Odontol Scand.* 2005;63:317–320.
10. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, a kol.: Účinek dlouhodobého konzumování probiotické bakterie *Lactobacillus rhamnosus* GG v mléce na zubní kaz a nebezpečí vzniku zubního kazu u dětí. *Caries Res.* 2001;35:412–420.
11. Tagg JR. Prevence streptokokální faryngitidy pomocí látek podobných bakteriocinu (BLIS) s blokací *Streptococcus pyogenes*, produkováných bakteriemi *Streptococcus salivarius*. *Indian J Med.* 2004;119:13–16.
12. Hyink O, Wescombe PA, Upton M, Ragland N, Burton JP, Tagg JR. Salivaricin A2 a neobvyklé lantibiotikum salivaricin B jsou zakódovány v přilehlých místech na přenosném megaplasmidu o 190 tisících bází v orální probiotické kmeni *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(4):1107–1113.
13. Sharma S, Verma KK. Infekce kůže a měkkých tkání. *Indian J Pediatr.* 2001;68(Suppl 3):S46–S50.
14. Wescombe PA, Burton JP, Cadieux PA, a kol. Megaplasmidy kódují rozlišovací kombinace lantibiotik v bakteriích *Streptococcus salivarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2006;90(3):269–280.

15. van Zon A, van der Heijden GJ, van Dongen TM, Burton MJ, Schilder AG. Antibiotika k léčbě zánětu středního ucha s výpotkem u dětí. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;9:CD009163.
16. Power DA, Burton JP, Chilcott CN, Dawes PJ, Tagg JR. Předběžný výzkum kolonizace tkání horních cest dýchacích u kojenců s použitím pediatrického přípravku z orálního probiotika *Streptococcus salivarius* K12. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(12): 1261–1263.
17. Horz HP, Meinelt A, Houben B, Conrads G. Distribuce a persistence probiotika *Streptococcus salivarius* K12 v ústní dutině člověka, jak je určena kvantitativní reakcí řetězce polymerázy v reálném čase. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(2):126–130.
18. Burton JP, Wescombe PA, Moore CJ, Chilcott CN, Tagg JR. Vyhodnocení bezpečnosti probiotika *Streptococcus salivarius* K12 v ústní dutině. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(4):3050–3053.
19. Burton JP, Cowley S, Simon RR, McKinney J, Wescombe PA, Tagg JR. Posouzení bezpečnosti a tolerance orálního probiotika *Streptococcus salivarius* K12 u lidí: a randomizovaná dvojitě zaslepená studie s kontrolou placebem. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(9):2356–2364.
20. Di Pierro F, Adami T, Rapacioli G, Giardini N, Streitberger C. Klinické posouzení orálního probiotika *Streptococcus salivarius* K12 v prevenci opakující se faryngitidy a/nebo tonsillitidy způsobené bakterií *Streptococcus pyogenes* u dospělých. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(3):339–343.
21. Di Pierro F, Donato G, Fomia F, a kol. Předběžné pediatrické klinické posouzení orálního probiotika *Streptococcus salivarius* K12 při prevenci opakující se a/nebo tonsillitidy způsobené bakterií *Streptococcus pyogenes* a opakujícího se akutního zánětu středního ucha. *Int J Gen Med*. 2012;5:991–997.
22. Di Pierro F, Colombo M, Zanvit A, Risso P, Rottoli AS. Použití bakterie *Streptococcus salivarius* K12 v prevenci streptokokální a virové faryngotonsillitidy u dětí. *Drug Healthc Patient Saf*. 2014;6:15–20.
23. Chilcott CN, Tagg JR. Antimikrobiální složení. Patent Spojených států US 7226590. 2007.
24. Heng NC, Haji-Ishak NS, Kalyan A, a kol. Sekvence genomu bakteriocinu produkujícího orálního probiotikum *Streptococcus salivarius* kmene M18. *J Bacteriol*. 2011;193:6402–6403.
25. Chen YY, Clancy KA, Burne RA. Ureáza *Streptococcus salivarius*: genetická a biochemická charakteristika a projev u streptokoka zubního plaku. *Infect Immun*. 1996;64:585–592.
26. Ohnishi Y, Kubo S, Ono Y, a kol. Klonování a sekvenování nového kódu dextranázy ze *Streptococcus salivarius*. *Gene*. 1995;156: 93–96.
27. Wescombe PA, Upton M, Renault P, a kol. Salivaricin 9, nové antibiotikum produkované bakterií *Streptococcus salivarius*. *Microbiology*. 2011;157: 1290–1299.
28. Burton JP, Wescombe PA, Macklaim JM, a kol. Persistence orálního probiotika *Streptococcus salivarius* M18 je závislá na dávkování a transfer megaplasmidem může zvýšit jejich produkci bakteriocinu a adhezi. *PLoS One*. 2013;8(6):e65991.
29. Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, a kol. Vliv probiotika *Streptococcus salivarius*, kmen M18, na index dentálního zdraví u dětí: randomizovaná dvojitě zaslepená studie, kontrolovaná placebem. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 6):875–884.
30. Litty S, Nagarathna D, Merline V. Probiotika v periodontální léčbě. *Int J Pharm Bio Sci*. 2015;6(1):242–250.
31. Bratthall D, Hänsel PG. Cariogram: model multifaktoriálního vyhodnocení rizika pro multifaktoriální onemocnění. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33:256–264.
32. Holgerson PL, Twetman S, Stecksøn-Blicks C. Validace programu vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu (Cariogram) v závislosti na věku u předškolních dětí. *Acta Odontol Scand*. 2009;67:106–112.
33. Hänsel Petersson G, Twetman S, Bratthall D. Posouzení počítačového programu k vyhodnocení nebezpečí vzniku zubního kazu u dětí školního věku. *Caries Res*. 2002;36:327–340.
34. Campus G, Cagetti MG, Sale S, Carta G, Lingström P. Validita Cariogramu u dětí školního věku: dvouletá následná studie. *Caries Res*. 2012;46:16–22.
35. Petersson GH, Isberg PE, Twetman S. Vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu u dětí školního věku s použitím redukovaného modelu bez testů slin. *BMC Oral Health*. 2010;19(10):5.
36. Zukanović A. Modely pro vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu v predikci kazivosti zubů. *Acta Med Acad*. 2013;42:198–208.
37. Alian AY, McNally ME, Fure S, Birkhed D. Vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu u starších pacientů s použitím modelu Cariogram. *J Can Dent Assoc*. 2006;72:459–463.
38. Celik EU, Gokay N, Ates M. Účinnost vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu u mladistvých s použitím Cariogramu. *Eur J Dent*. 2012;6:270–279.
39. Tellez M, Gomez J, Ellwood R, Ismail AI. Důkaz o systémech vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu: jsou prognostické v oblasti budoucí kazivosti? *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013;41(1):67–78.
40. Campus G, Cagetti MG, Sacco G, Benedetti G, Strohmenger L, Lingström P. Profily rizika vzniku zubního kazu u sardinských dětí školního věku s použitím Cariogramu. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(3):146–152.
41. Hänsel Petersson G, Twetman S, Bratthall D. Posouzení počítačového programu pro vyhodnocení rizika vzniku zubního kazu u dětí školního věku. *Caries Res*. 2002;36(5):327–340.
42. Baehni PC, Guggenheim B. Potenciál diagnostické mikrobiologie pro léčbu a prognózu zubního kazu a periodontálních chorob. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(3):259–277.

STREPTOCOCCUS SALIVARIUS K12 INHIBUJE AKTIVACI IMUNITNÍHO SYSTÉMU PATOGENY PARODONTÁLNÍHO ONEMOCNĚNÍ

Kyle W. MacDonald^{1,2}, Ryan M. Chanyi^{1,2}, Jean M. Macklaim^{2,3}, Peter A. Cadieux^{2,4}, Gregor Reid^{1,2} a Jeremy P. Burton^{1,2,5}

Abstrakt

Souvislosti: Parodontální onemocnění představuje závažný zdravotní problém. Podávání prospěšných mikrobů je stále populárnější než snahy o manipulaci s mikrobiomem pomocí antimikrobiálních látek. Tato studie zjišťovala schopnost *Streptococcus salivarius* inhibovat produkci IL-6 a IL-8 gingiválními fibroblasty při aktivaci parodontálními patogeny a jejich vliv na slinný mikrobiom.

Metody: Primární lidské gingivální fibroblasty byly vystaveny působení *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Fusobacterium nucleatum* a kombinace všech tří. Bylo měřeno uvolňování cytokinů IL-6 a IL-8. Na stejném modelu byly fibroblastům indukovaným patogenem podávány *S. salivarius* K12, M18 a různé frakce supernatantu a celobuněčného lyzátu *S. salivarius* K12. Byla také provedena studie na zdravých pacientech s cílem zjistit vliv *S. salivarius* K12 na nativní mikrobiom pomocí sekvenční analýzy 16S nové generace.

Výsledek: Všechny testované patogeny vyvolaly významnou odpověď IL-6 a IL-8.

S. salivarius K12 nebo M18 nevykazovaly zvýšení zánětlivých cytokinů. Při současném podávání kteréhokoli z probiotických kmenů s patogenem došlo k významnému snížení uvolňování IL-6 i IL-8. Tento účinek byl rovněž pozorován, když byly gingivální fibroblasty předem ošetřeny *S. salivarius* K12 nebo M18 a poté stimulovány orálními patogeny. Žvýkačky obsahující *S. salivarius* K12 nezměnily slinný mikrobiom a nezvýšily zánětlivé markery v ústní dutině.

Závěr: *S. salivarius* K12 a M18 zabránily aktivaci imunitního systému vyvolané patogeny parodontálního onemocnění. *S. salivarius* K12 nezměnil mikrobiom slin ani nevyvolal aktivaci imunitního systému, když byl podáván jako žvýkačka. Tyto výsledky si zaslouží další studii, aby se zjistilo, zda může jít o účinnou léčbu na modelu parodontálního onemocnění.

Klíčová slova: *Streptococcus salivarius*, parodontální onemocnění, imunitní inhibice, probiotika, žvýkačky, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*

Souvislosti

Parodontální onemocnění je charakterizováno zánětem tkání, které obklopují a podpírají zuby, včetně dásní a parodontálních vazů.

Předpokládá se, že až 50 % dospělých Severoameričanů trpí nějakou formou parodontálního onemocnění, což z něj činí závažný problém pro veřejné zdraví^[1]. Ústní dutina je bohatá na mikroorganismy, které se souhrnně označují jako „ústní mikrobiota“. V průběhu onemocnění se ústní mikrobiota mění ze společenstva s převahou grampozitivních bakterií na společenstvo tvořené převážně gramnegativními bakteriemi^[2].

Mezi bakterie, které jsou klasicky považovány za silně spojené s parodontálním onemocněním, patří *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* a *Fusobacterium nucleatum*^[3]. Jedná se o anaerobní bakterie, které vyvolávají uvolňování prozánětlivých cytokinů, což vede k nábóru imunitních buněk, destrukci tkání a případné ztrátě kostní hmoty. Mezi cytokiny důležité v tomto destruktivním cyklu patří IL-1 β (kostní resorpce, produkce metaloproteináz), IL-6 (aktivace B-buněk), IL-8 (přitahování a aktivace neutrofilů) a TNF- α (kostní resorpce)^[4].

Onemocnění dutiny ústní je celosvětově čtvrtým nejnákladnějším onemocněním^[5] a jsou zapotřebí jednoduchá a dostupná řešení. V kombinaci s nárůstem rezistence vůči antibiotikům se vyvíjí mnoho nových terapeutických přístupů, které mají pomoci zlepšit zdraví ústní dutiny a minimalizovat dopad na pacienta. Jedním z nich je využití prospěšných bakterií k obraně ústní mikrobioty před dysbiotickým stavem a zhoršením onemocnění. Je důležité, aby léčebná strategie zachovala integritu původního mikrobiomu, aniž by jej narušila. Léčba zahrnující živé bakterie by také neměla být odhalena imunitním systémem, jinak hrozí zhoršení příznaků onemocnění nebo snížení účinnosti léčby. Existuje několik mechanismů účinku, kterými probiotika přímo nebo nepřímo působí příznivě a které mohou pomoci v ústní dutině. Nejúčinnější z hlediska ochrany před ústními patogeny je přímá konkurence s jiným organismem prostřednictvím produkce přírodních antimikrobiálních sloučenin, známých jako bakteriociny^[6]. Další mechanismy posilují imunitní regulaci^[7], zlepšují integritu epitelálních bariér a funkci těsných spojů^[8,9] a produkci metabolitů^[10], enzymů, kofaktorů a vitaminů^[11], což vše prospívá zdraví hostitele. Probiotika určená k léčbě parodontózy byla testována se slibnými výsledky. Teughels et al.^[16] zkoumali denní užívání pastilky s obsahem *Lactobacillus reuteri* u pacientů trpících chronickou parodontitidou po standardním odstranění zubního kamene a kořenového nátěru. Tato léčba vedla k významnému snížení hloubky kapsy a nárůstu attachmentu v hlubokých parodontálních kapsech, stejně jako ke snížení výskytu *P. gingivalis* ve srovnání s osobami, které dostávaly pastilky s pla-

cebem. Podobná studie s použitím tablet obsahujících *Lactobacillus salivarius* WB21 prokázala schopnost této bakterie snížit index plaku a hloubku parodontální kapsy u osob s vysokým rizikem parodontálního onemocnění^[17]. Hlavním konečným metabolickým produktem mnoha těchto potenciálních probiotik je kyselina mléčná, která může mít časem negativní vliv na zubní kaz. Pro dosažení nejlepšího výsledku může být vhodnější kolonizátor ústní mikroflóry, který nevylučuje kyseliny a produkuje bakteriociny. *Streptococcus salivarius* je grampozitivní bakterie, která kolonizuje ústní dutinu člověka po celý život hostitele a je obecně spojována se zdravím^[18]. *S. salivarius* K12 a M18 mají in vitro inhibiční aktivitu proti dalšímu orálnímu patogenu, *Streptococcus pyogenes*^[19]. Oba kmeny kódují mnohočetné bakteriociny^[20,21], jsou bezpečné pro lidskou konzumaci^[22–24] a mohou přetrvávat v ústní dutině^[25,26], zejména na hřbetě jazyka a dalších sliznicích. V placebem kontrolovaných studiích bylo prokázáno, že *S. salivarius* K12 zabraňuje opakovaným streptokokovým zánětům hltanu u dospělých^[27] a dětí^[28] a omezuje zápach z úst omezením produkce těkavých sirných sloučenin z anaerobních bakterií.

Užívání *S. salivarius* M18 dokázalo snížit skóre zubního plaku a koncentraci *S. mutans* u dětí^[29].

Vzhledem k tomu, že parodontální onemocnění je primárně způsobeno zánětem a *S. salivarius* K12 a M18 mají prokázanou bezpečnost a efektivní kolonizaci v lidské dutině ústní, rozhodli jsme se charakterizovat, zda *S. salivarius* K12 nebo M18 mohou modulovat zánětlivé faktory produkované lidskými gingiválními fibroblasty vystavenými běžným dentálními patogenům a zda u zdravých dobrovolníků dojde ke změnám ve slinném mikrobiomu nebo vylučovaných cytokinech při zvýšené expozici *S. salivarius*.

Metody

Etické schválení

Studie byla schválena etickou komisí pro výzkum v oblasti zdravotnických věd na University of Western Ontario (REB 104641, 1. 3. 2014) a komisí pro dopady klinického výzkumu na Lawson Health Research Institute (R-13-523). Všichni účastníci udělili souhlas se zveřejněním a byly odstraněny veškeré identifikační údaje.

Kultury a podmínky růstu

Kmeny použité v této studii jsou uvedeny v tabulce 1. *S. salivarius*, *S. mutans* 25175, *C. albicans* a devět indikačních kmenů (I1 až I9) bylo udržováno na médiu Brain Heart Infusion obsahujícím 0,6 % (w/v) kvasničného extraktu.

A. actinomycetemcomitans, *P. gingivalis* a *F. nucleatum* byly kultivovány anaerobně na Columbia Blood agar (CBA) obsahujícím 5 % ovčí krve při 37 °C v anaerobní komoře obsahující 85 % (v/v) N₂, 10 % (v/v) H₂ a 5 % (v/v) CO₂. Kmeny *Lactobacillus* byly udržovány v médiu De Mann, Rogosa, Sharpe (MRS). V případě potřeby byl pro množení na destičkách použit 1,5% (w/v) agar.

Primární lidské gingivální fibroblasty

Gingivální fibroblasty byly kultivovány z explantované tkáně získané od zdravých dobrovolníků podstupujících parodontální zákroky na klinice ústní chirurgie (Western University, Kanada) v souladu s pokyny univerzitní etické komise pro výzkum (REB 13937E) s informovaným souhlasem pacienta. Parodontální fibroblasty byly v minimálním esenciálním médiu (MEM) doplněném 10% (v/v) fetálním hovězím sérem a 100 mM L-glutaminu ve zvlhčeném inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Experimenty byly prováděny na gingiválních fibroblastech mezi pasážemi 4 až 9. Fibroblasty byly inokulovány (5 × 10⁵ buněk) do 24jamkové destičky s 500 µl média doplněného MEM a pěstovány po dobu 48 hodin do dosažení konfluence.

Tabulka 1. Kultury použité v této studii

Mikroorganismy	Kmen
Kvasinky	
<i>Candida albicans</i>	TIMM 1768
Bakterie	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Y4 (ATCC 43718)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC10593
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC25175
<i>Streptococcus salivarius</i>	K12
<i>Streptococcus salivarius</i>	M18
<i>Lactobacillus reuteri</i>	RC-14
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lp-2001
<i>Lactobacillus helveticus</i>	LAFTI L-10
Bakteriální indikační kmeny	
<i>Micrococcus luteus</i>	I1 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)
<i>Streptococcus pyogenes</i> typu M 52	I2 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)
<i>Streptococcus constellatus</i>	I3 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)
<i>Streptococcus uberis</i>	I4 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)
<i>Streptococcus pyogenes</i> typu M 4	I5 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	I6 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)
<i>Streptococcus pyogenes</i> typu M 87	I8 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	I9 S laskavým svolením J. R. Tagga (Otago)

Současný bakteriální antagonismus

Současné testy bakteriálního antagonismu byly provedeny podle předchozího popisu [19]. Krátce řečeno, jednodenní kultury indikátorových kmenů nebo patogenů (tabulka 1) byly rovnoměrně rozprostřeny po povrchu destičky CBA. Jednotlivé kolonie *S. salivarius* K12 a M18 byly použity k inokulaci destičky CBA a inkubovány po dobu 48 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. K posouzení přímého antagonického účinku bakterií na růst patogenu byly použity zóny inhibice kolem inokula.

Odložený bakteriální antagonismus

Jediná kolonie *S. salivarius* K12 nebo M18 byla použita k inokulaci 1 cm širokého pruhu na destičce CBA a inkubována při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂ po dobu 18 hodin. Bakteriální nárůst byl z destičky odstraněn pomocí sterilního vatového tamponu a poté sterilizován parami chloroformu po dobu 20 minut. Po vysušení byly indikátorové kmeny a patogeny naočkovány na destičku jako kolmá linie k předchozímu růstu. Destička byla dále inkubována 48 hodin při teplotě 37 °C a 5 %

CO₂. Vzhledem k tomu, že z probiotických bakterií zůstaly pouze vylučované vedlejší produkty, lze jakoukoli inhibiční aktivitu vůči růstu patogenu přičíst metabolitu vylučovanému během normálního růstu, a nikoli stimulovanému přímou konkurencí.

Koagregace s parodontálními patogeny

Noční kultury každého bakteriálního kmene byly odstředovány při 3 000× g po dobu 10 minut a třikrát promyty ve sterilním PBS. Kultury byly resuspendovány v konečném objemu PBS, aby bylo dosaženo optické hustoty (OD₆₀₀) 1,0. Každý patogen byl smíchán ve stejném poměru se *S. salivarius* K12 nebo M18. Zákal kultur byl zaznamenán po 8 hodinách společně a porovnán s jednotlivými kulturami. Jako pozitivní a negativní kontrola byly použity *C. albicans* a *S. mutans* na základě známých koagregačních schopností. Kultuře bylo přiděleno skóre na základě pozorované agregace.

Uchycení *S. salivarius* na primární lidské gingivální fibroblasty

Primární lidské gingivální fibroblasty byly zpracovány podle výše uvedeného popisu. Jednodenní kultury *S. salivarius* K12 a M18 byly odstředovány při 3 000× g po dobu 10 minut a resuspendovány ve stejném objemu fosfátem pufovaného fyziologického roztoku. Tento postup byl třikrát opakován, aby se odstranily zbytky bakteriálního média. *S. salivarius* K12 a M18 byly resuspendovány v doplněném MEM a přidány ke gingiválním fibroblastům v multiplicitě infekce (MOI) 25 : 1 a inkubovány po dobu 8 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. Monovrstvy byly třikrát promyty sterilním PBS, aby se odstranily neadherentní bakterie. K lyzi fibroblastů byl přidán Triton X-100 (0,1 % v/v), čímž se uvolnil adhezaní *S. salivarius* K12. Bakteriální CFU byly stanoveny pomocí ředění na CBA. Destičky byly inkubovány při 37 °C a 5 % CO₂ přes noc.

Vystavení dášňových fibroblastů působení a analýza cytokinů

Protizánětlivé účinky *S. salivarius* K12 a M18 byly zkoumány na modelu stimulace gingiválních fibroblastů. Fibroblasty byly připraveny na 24jamkových destičkách, jak je vysvětleno výše. *S. salivarius*, patogen nebo jejich kombinace byly přidány k fibroblastům v MOI 25 : 1. Bakterie byly koinkubovány s fibroblasty po dobu 8 hodin, poté byl odebrán kultivační supernatant, krátce odstředěn, aby se odstranily větší zbytky, a uložen při –20 °C pro další analýzu. Podobně byl zkoumán účinek předběžného ošetření kmeny *S. salivarius*, kdy byl 30 minut před přidáním parodontálních patogenů aplikován na gingivální fibroblasty buď *S. salivarius* K12, nebo M18. Poté se dále inkubovalo po dobu 8 hodin, supernatant byl odebrán, krátce odstředěn a uložen při –20 °C až do další analýzy. Ve všech vzorcích byla stanovena koncentrace IL-6 a IL-8 pomocí multiplexní imunoanalytické soupravy (Luminex).

Analýza supernatantu

Aby se zjistilo, zda *S. salivarius* K12 produkuje nějaké rozpustné protizánětlivé faktory, byl kultivován přes noc při 37 °C, odstředěn a vzniklý supernatant byl sterilizován filtrem o velikosti póru 0,22 µm a poté aplikován na fibroblasty stimulované *F. nucleatum* po dobu 8 hodin. Pro další analýzu byl supernatant *S. salivarius* K12 frakcionován s použitím 10 kDa filtru (Centricon® Plus-70), přičemž jak frakce < 10 kDa, tak frakce > 10 kDa byly testovány na stimulovaných fibroblastech.

Příprava extraktu po zmrazení a rozmrazení

Pro posouzení produkce intracelulárních sloučenin produkovaných *S. salivarius* K12, které mohou inhibovat imunitní aktivaci gingiválních fibroblastů *F. nucleatum*, byl připraven extrakt z rovnoměrné kultury *S. salivarius* K12, který byl rozmrazen. Rovnoměrná kultura *S. salivarius* K12 byla pěstována na CBA po dobu 48 hodin při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Destička byla na 4 hodiny umístěna do –80 °C, rozmrazena při pokojové teplotě a z degradované matrice byla odebrána vzniklá kapalina. Ta byla sterilizována filtrem o velikosti póru 0,22 µm. Frakce tohoto extraktu z rozmrazování byly navíc podrobeny tepelnému zpracování při 80 °C po dobu 10 minut nebo tráveny po dobu 10 minut pomocí 0,05% trypsinu při 37 °C v atmosféře obohacené 5 % CO₂. Tyto frakce byly přidány k *F. nucleatum* a byly koinkubovány, aby stimulovaly fibroblasty po dobu 8 hodin, a IL-8 byl měřen, jak je popsáno výše.

Design studie probiotických žvýkaček

Byli vybráni účastníci ve věku 20–60 let s celkově dobrým stavem ústní dutiny. Byli vyloučeni ti účastníci, kteří trpěli onemocněním dutiny ústní, měli zubní implantáty, v současné době užívali antibiotika nebo měli v průběhu studie naplánovanou návštěvu zubního lékaře. Bylo vybráno celkem dvacet zdravých dospělých dobrovolníků, kteří byli rozděleni do dvou studijních skupin ($n = 10$), odpovídajících věkem a pohlavím. Účastníci dostávali buď žvýkačky obsahující *S. salivarius* K12 (CulturedCare™ s BLIS K12™; skupina 1), nebo běžné žvýkačky bez *S. salivarius* K12 (skupina 2). Každé osobě byl přidělen jedinečný identifikační kód, aby byla zajištěna anonymita a abychom nevěděli, ke které skupině daný vzorek patří. Oba typy žvýkaček měly podobnou chuť, vzhled i strukturu. Účastníkům bylo poskytnuto dostatečné množství žvýkaček na celou dobu trvání studie. Po dobu 7 dní byl v příslušných časových bodech odebrán vzorek 3 ml nestimulovaných slin, po nichž následovalo dalších 7 dní vymývání. Vzorky byly skladovány při teplotě -80°C , dokud nebyly obdrženy všechny vzorky od všech účastníků. Jeden účastník nebyl schopen poskytnout všechny vzorky a byl z analýzy vyloučen.

Uvolňování cytokinů in vivo

IL-1 β , IL-6, IL-8 a TNF- α byly měřeny ve vzorcích slin pomocí multiplexní imunoanalýzy, jak je popsáno výše, podle pokynů výrobce (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA). Byl použit systém čtení Bio-Plex 200 (Bio-Rad), který využívá technologii Luminex® xMAP založenou na fluorescenčních kuličkách (Luminex Corporation, Austin, TX).

Analýza mikrobiomu slin

DNA byla extrahována ze vzorků slin pomocí izolační soupravy DNeasy PowerSoil 96-well Kit (Qiagen). Extrakce byla provedena podle protokolu výrobce se dvěma změnami: před krokem rozbíjení kuličkami byl přidán 10minutový inkubační krok při 65°C v kuličkové lázni a doba centrifugace pro každý krok byla zdvojnásobena. Pro extrakci 94 vzorků bylo použito celkem 500 μl slin. Extrahované vzorky byly amplifikovány pomocí PCR pro oblast V4 genu 16S rRNA s použitím následujících primerů s čárovým kódem: V4L (forward) 5' GTGCCAGC[CA] GCCGCGGTAA 3' a V4R (reverse) 5' GGACTA C[ATC][ACG]GGGT[AT]TCTAAT 3'. Amplifikace byla provedena v reakci 42 μl s 10 μl každého primeru (3,2 pMol/ μl zásoby), 20 μl GoTaq hot start master mixu (Promega) a 2 μl extrahované DNA. Podmínky termocyklace byly následující: počáteční aktivace při 95°C po dobu 2 minut, poté 25 cyklů po dobu 1 minuty při 95°C pro denaturaci, po dobu 1 minuty při 55°C pro žhání primerů a 1 minuty při 72°C pro extenzi. Produkty PCR byly kvantifikovány pomocí fluorimetru Qubit 2.0 a vysoce citlivých dsDNA specifických fluorescenčních sond (Life Technologies). Vzorky byly smíchány v ekvimolárních koncentracích a přečištěny pomocí soupravy QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). Sloučený produkt byl odeslán do Londýnského regionálního genomického centra (Robarts Research Institute, Western University, London, Kanada) k sekvenování na platformě Illumina MiSeq s použitím sady pro 600 cyklů k získání 2×300 párových sekvenčních čtení. Při použití vlastních skriptů Perl a Shell byla čtení zachována, pokud se sekvence shodovala s primerem, přičemž byly povoleny neshody u 2 bp, a pokud zároveň vykazovala dokonalou shodu s očekávanými čárovými kódy sekvencí. Párová čtení, která prošla tímto filtrem, byla překryta pomocí pandaseq (<https://github.com/neufeld/pandaseq>), čímž vznikly sekvence V4 plné délky přiřazené podle vzorku. Operační taxonomické jednotky (OTU) byly vytvořeny shlukováním čtení V4 při 97% identitě sekvence pomocí USearch v. 7 (<http://www.drive5.com/usearch/>).

OTU byly ponechány, pokud představovaly alespoň 0,1 % relativní četnosti v jednom vzorku. Jako referenční sekvence pro taxonomickou klasifikaci byla použita nejhojnější sekvence ve shluku. Referenční sekvence OTU byly porovnány s projektem ribozomální databáze v11.2 (RDP; <https://rdp.cme.msu.edu>) pomocí Seqmatch v. 3 a z 20 nejlepších shod byla ponechána nejnížší společná taxonomie se skóre $S_{ab} \geq 0,5$. Sekvence OTU z rozdílných taxonomických skupin byly dále ověřeny pomocí algoritmu BLAST proti Human Oral Microbiome Database (HOMD) v. 13.2 (<http://www.homd.org>). Tabulka OTU s přiřazenými taxonomiemi byla importována do QIIME (<http://qiime.org>) pro průzkumné analýzy včetně sumarizace

čtení na různé taxonomické úrovni, generování beta diverzity pomocí vážené vzdálenosti UniFrac na základě zarovnání sekvencí OTU pomocí algoritmu MUSCLE a hlavní souřadnicové analýzy (PCoA). Sloupcové grafy, proužkové grafy a grafy PCoA byly vytvořeny pomocí R.

Statistická analýza

Experimenty byly prováděny minimálně ve třech opakováních. Data byla analyzována pomocí programu GraphPad Prism (verze 9.0.0 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA) s použitím jednocestné nebo dvoucestné analýzy rozptylu ANOVA, případně s Dunnettovým nebo Tukeyho post-hoc testem mnohonásobného porovnání, jak je popsáno v legendě obrázku. Při porovnávání více skupin s kontrolní skupinou byl zvolen Dunnettův post-hoc test. Při porovnávání více skupin mezi sebou byl zvolen Tukeyho post-hoc test. Pro analýzu mikrobiomu byla porovnání mezi skupinami pro diferenciální analýzu mikrobioty provedena pomocí analýzy ALDEx2 (<http://www.bioconductor.org/packaged/release/bioc/html/ALDEx2.html>) v R. Taxonomické shluky byly považovány za diferenciální mezi skupinami s upravenou p-hodnotou $< 0,01$ pomocí Welchova t-testu s korekcí Benjamini-Hochbergova vícenásobného testu a s velikostí účinku $\geq 1,5$.

Výsledky

Interakce S. salivarius s ústními patogeny

Na základě předchozí literatury bylo potvrzeno, že jak *S. salivarius* K12, tak M18 vykazují silnou přímou a odloženou inhibici vůči všem 9 indikátorovým kmenům (tabulka 2), čímž získal P-typ 7-7-7. Při analýze rozšířeného spektra nebyly kmeny K12 ani M18 schopny inhibovat *C. albicans*, *S. mutans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* ani *A. actinomycetemcomitans* pomocí testů přímého a odloženého antagonismu (tabulka 2). Test koagregace prokázal, že K12 i M18 jsou schopny mírně koagregovat s *P. gingivalis* a *F. nucleatum* a slabě s *A. actinomycetemcomitans* (tabulka 3). U žádného z kmenů a *S. mutans* nebyla pozorována koagregace (tabulka 3).

Tabulka 2. Současný a odložený bakteriální antagonismus

Indikátorový kmen	Současný antagonismus producentského kmene <i>S. salivarius</i>		Odložený antagonismus producentského kmene <i>S. salivarius</i>	
	K12 †	M18 ‡	K12	M18
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	–§	–	–	–
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC10593	–	–	–	–
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> Y4	–	–	–	–
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC25175	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i> TIMM 1768	–	–	–	–
<i>Micrococcus luteus</i> (I1)	++¶	++	++	++
<i>Streptococcus pyogenes</i> M-type 52 (I2)	++	++	++	++
<i>Streptococcus constellatus</i> (I3)	++	++	++	++
<i>Streptococcus uberis</i> (I4)	++	++	++	++
<i>Streptococcus pyogenes</i> M-type 4 (I5)	++	++	++	++
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (I6)	++	++	++	++
<i>Streptococcus pyogenes</i> M-type 28 (I7)	++	++	++	++
<i>Streptococcus pyogenes</i> M-type 87 (I8)	++	++	++	++
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (I9)	++	++	++	++

Inhibice růstu bakterií *S. salivarius* K12 nebo M18. Výsledky byly konzistentní ve všech třech provedených experimentech.

† *Streptococcus salivarius* K12; ‡ *Streptococcus salivarius* M18; §(–) žádná inhibice;

¶(++) silná inhibice

Tabulka 3. Bakteriální koagregace

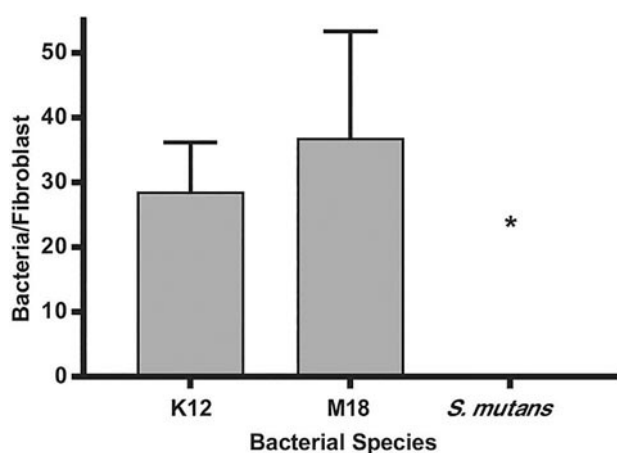
Kmen <i>S. salivarius</i>	Patogen			
	<i>P. gingivalis</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>S. mutans</i>
K12 ⁺	++ [§]	++	+	— [¶]
M18*	++	++	+	—

Schopnost *S. salivarius* K12/M18 koagregovat v roztoku s různými patogeny. Výsledky byly konzistentní ve všech třech provedených experimentech.

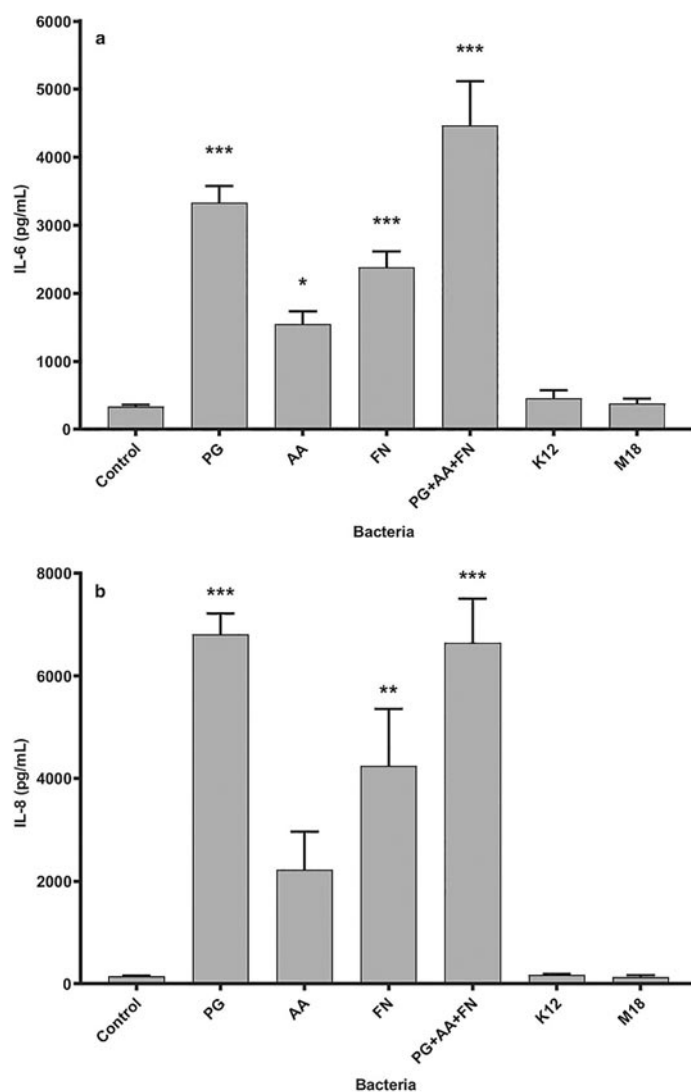
† *S. salivarius* K12; § *S. salivarius* M18; § (++) mírná precipitace s rovnoměrně zakaleným supernatantem a známkami flokulace; ¶ (—) bez koagregace, rovnoměrně zakalená suspenze

Vystavení působení primárních lidských dásňových fibroblastů

S. salivarius K12 i M18 byly schopny adherovat k primárním lidským gingiválním fibroblastům v poměru 30 bakteriálních buněk na fibroblast, přičemž mezi nimi nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl (obr. 1). Pro srovnání, široce používané probiotikum *L. reuteri* RC-14 adherovalo v poměru 5 bakteriálních buněk na fibroblast. Proto jsme se snažili zjistit, zda schopnost K12 a M18 koagregovat s patogeny v ústní dutině negativně ovlivní zánětlivou odpověď ústní dutiny.



Obr. 1: Adherence bakterií k lidským gingiválním fibroblastům. Připojení bakterií k primárním lidským gingiválním fibroblastům in vitro po 8hodinové koinkubaci. *S. salivarius* K12 (K12); *S. salivarius* M18 (M18); *S. mutans* ATCC25175. Test byl proveden v trojicích při třech různých příležitostech. Vzorky byly analyzovány pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým testem mnohonásobného porovnání s K12 jako kontrolou (* $p < 0,05$ ve srovnání s připojením K12). Chybové úsečky představují standardní chybu průměru $\pm$



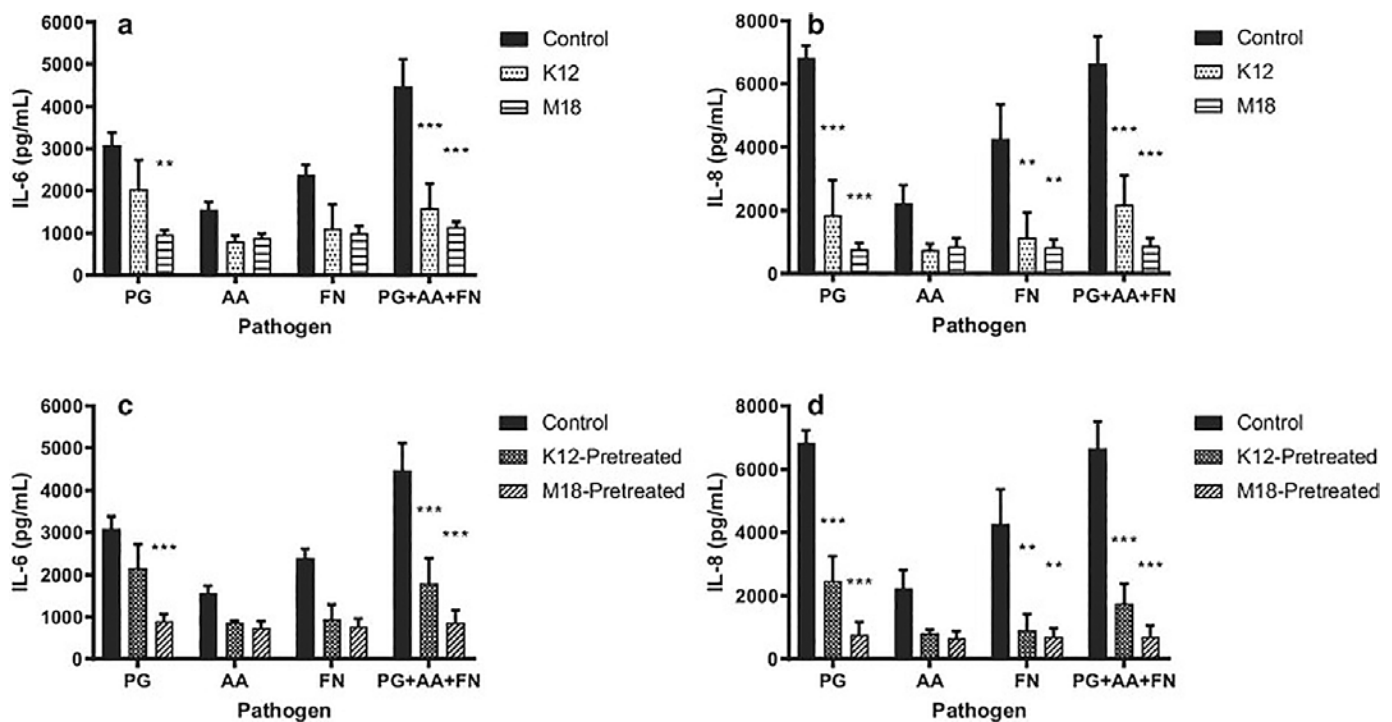
Obr. 2: Stimulace produkce cytokinů z lidských gingiválních fibroblastů. Uvolňování IL-6 (a) a IL-8 (b) primárními lidskými gingiválními fibroblasty indukované 8hodinovou koinkubací s *P. gingivalis* (PG); *A. actinomycetemcomitans* (AA); *F. nucleatum* (FN); *S. salivarius* K12 (K12); nebo *S. salivarius* M18 (M18). Vzorky byly analyzovány pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým testem mnohonásobného porovnání ve srovnání s kontrolou (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve srovnání s kontrolou). Chybové úsečky představují standardní chybu průměru $\pm$

Výchozí koncentrace IL-6 a IL-8 z nestimulovaných gingiválních fibroblastů byly 330,3 pg/ml a 149,1 pg/ml (obr. 2). Všechny tři testované parodontální patogeny významně zvýšily uvolňování IL-6 (obr. 2a) a IL-8 (obr. 2b). *P. gingivalis* významně aktivoval největší uvolňování IL-6 (3 333,9 pg/ml; $p < 0,001$) a IL-8 (6 812,5 pg/ml; $p < 0,001$) z gingiválních fibroblastů, následovaný *F. nucleatum* (IL-6 = 2 382,4 pg/ml, $p = 0,0009$; IL-8 = 4 251,8 pg/ml; $p = 0,005$) a nakonec *A. actinomycetemcomitans* (IL-6 = 1 551 pg/ml; NS při $p = 0,0595$; IL-8 = 2 225,3 pg/ml, NS při $p = 0,278$). Kombinace těchto tří patogenů dále stimulovala uvolňování IL-6 na 4 466,6 pg/ml, což bylo více než u kteréhokoli jednotlivého kmene (obr. 2a), významně více než u samotného *A. actinomycetemcomitans* ($p < 0,0001$) a samotného *F. nucleatum* ($p = 0,0015$). Kombinace dále nezvyšila uvolňování IL-8 (6 645,7 pg/ml) nad rámec samotné *P. gingivalis* (obr. 2b). Navzdory schopnosti adherovat k fibroblastům nevyvolávaly *S. salivarius* K12 nebo M18 odpověď IL-6 nebo IL-8 (obr. 2a, b; NS oproti kontrole).

Při použití stejného in vitro modelového systému byly *S. salivarius* K12 nebo M18 aplikovány buď současně na fibroblasty s *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* (obr. 3a, b), nebo byly preinkubovány s gingiválními fibroblasty 30 minut před jejich napadením patogeny (obr. 3c, d). Při současném přidání byl kmen *S. salivarius* M18 schopen významně snížit produkci IL-6 indukovanou *P. gingivalis* (obr. 3a; $p = 0,0012$). Jak *S. salivarius* K12, tak M18 dokázaly významně snížit pro-

dukci IL-6 indukovanou kombinací všech tří patogenů (obr. 3a; $p < 0,0001$). Podobně oba kmeny *S. salivarius* K12 a M18 inhibovaly produkci IL-8 (obr. 3b) indukovanou *P. gingivalis* ($p < 0,001$), *F. nucleatum* ($p = 0,0059$, resp. $p = 0,0021$) a kombinací těchto tří patogenů ($p < 0,001$). Ačkoli ne všechny pokusy byly významné, současné podávání *S. salivarius* K12 nebo M18 s kterýmkoli z patogenů prokázalo minimální inhibici 34,1 % pro IL-6 a 61,5 % pro IL-8.

Kromě toho byl *S. salivarius* M18 po přidání jako předúprava schopen významně snížit sekreci IL-6 indukovanou samotnými *P. gingivalis* (obr. 3c; $p = 0,0012$). Jak *S. salivarius* K12, tak M18 byly schopny významně inhibovat indukci IL-6 kombinací všech tří patogenů o 60,0 %, resp. 80,7 % (obr. 3c; $p < 0,001$). Podobně K12 i M18 dokázaly významně inhibovat IL-8 indukovaný *P. gingivalis* (obr. 3d; $p < 0,001$) a *F. nucleatum* ($p = 0,0027$, $p = 0,0013$) a kombinací všech tří patogenů ($p < 0,001$). Ve všech testovaných vzorcích *S. salivarius* K12 a M18 inhibovaly uvolňování cytokinů gingiválními fibroblasty s minimální inhibicí 30 % a 63,2 % pro IL-6 a IL-8. Důležité je, že přídavek *S. salivarius* K12 nebo M18 za žádných okolností nezvyšil produkci IL-6 nebo IL-8 z fibroblastů stimulovaných patogenem.



Obr. 3: *S. salivarius* snižuje uvolňování cytokinů stimulovaných patogenem. Uvolňování IL-6 (a) a IL-8 (b) z primárních lidských gingiválních fibroblastů indukované *P. gingivalis* (PG); *A. actinomycetemcomitans* (AA); *F. nucleatum* (FN) při koinkubaci se *S. salivarius* K12 (K12) nebo M18 (M18). Uvolňování IL-6 (c) a IL-8 (d) z gingiválních fibroblastů indukované orálními patogeny, když byl *S. salivarius* K12 (K12-Pretreated) nebo M18 (M18-Pretreated) přidán k fibroblastům jako předúprava 30 minut před napadením patogeny. Vzorky byly analyzovány pomocí dvoucestné analýzy ANOVA s Tukeyho testem mnohonásobného srovnání v rámci každé skupiny patogenů (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Chybové úsečky představují standardní chybu průměru $\pm$

Stanovení protizánětlivého faktoru

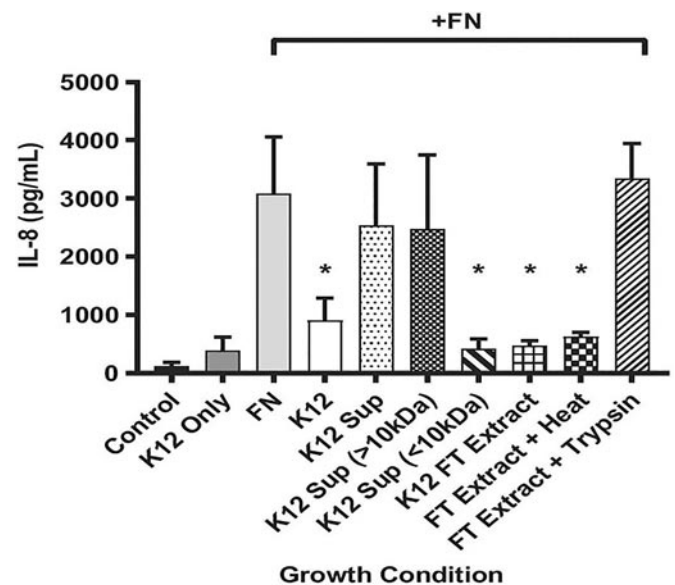
Předtím bylo zjištěno, že *S. salivarius* K12 ani M18 nejsou schopny přímo ani nepřímo (odložený antagonismus) inhibovat růst patogenu, a proto musí existovat jiný mechanismus účinku, který vysvětluje snížení odpovědi IL-6 a IL-8 gingiválních fibroblastů vyvolané těmito patogeny. Se zaměřením na uvolňování IL-8 vyvolané *F. nucleatum* byly zkoumány různé frakce *S. salivarius* K12, aby se objasnil odpovědný faktor. Obrázek 4 ukazuje, že podle očekávání bylo uvolňování IL-8 inhibováno *S. salivarius* K12 při indukci *F. nucleatum*. Filtrem sterilizovaný supernatant celých bakterií *S. salivarius* K12 překvapivě nezabránil uvolňování IL-8, avšak při frakcionaci supernatantu byla menší velikostní frakce obsahující metabolity < 10 kDa schopna významně inhibovat uvolňování IL-8 ($p = 0,0111$).

To je s největší pravděpodobností způsobeno koncentrací původce během frakcionace, což je důvod, proč celý supernatant neměl stejný účinek. Aby se zjistilo, zda *S. salivarius* produkuje tuto sloučeninu na pevném povrchu, byl kultivován na agarových plotnách a hrubě lyzován procesem zmrazování a rozmrazování, který, jak známo, uvolňuje intracelulární složky do koncentrované frakce, kterou lze snadno izolovat. Frakce po zmrazení/rozmrazení (FT extrakt) významně inhibovala uvolňování IL-8 (obr. 4; $p = 0,0126$). Bylo také potvrzeno, že látka je tepelně stabilní a stále aktivní po ošetření při 80°C po dobu 10 minut ($p = 0,0186$); byla však inaktivována, když byla podrobena trypsinovému štěpení. Lze tedy vyvodit závěr, že odpovědnou látkou je malá molekula o velikosti menší než 10 kDa, tepelně stabilní a bílkovinné povahy, která se vylučuje v malém množství, ale není antimikrobiální vůči testovaným patogenům na základě přímých a odložených antagonistických testů (tabulka 2).

Účinky probiotických žvýkaček na zdravý slinný mikrobiom

Za účelem zjištění vlivu probiotické žvýkačky obsahující *S. salivarius* K12 na zdravý mikrobiom a zánětlivé markery byla provedena studie na lidech, které se zúčastnilo devatenáct zdravých dobrovolníků. Vzorky byly odebrány na začátku, po 4 hodinách, 24 hodinách, 7 dnech a 14 dnech.

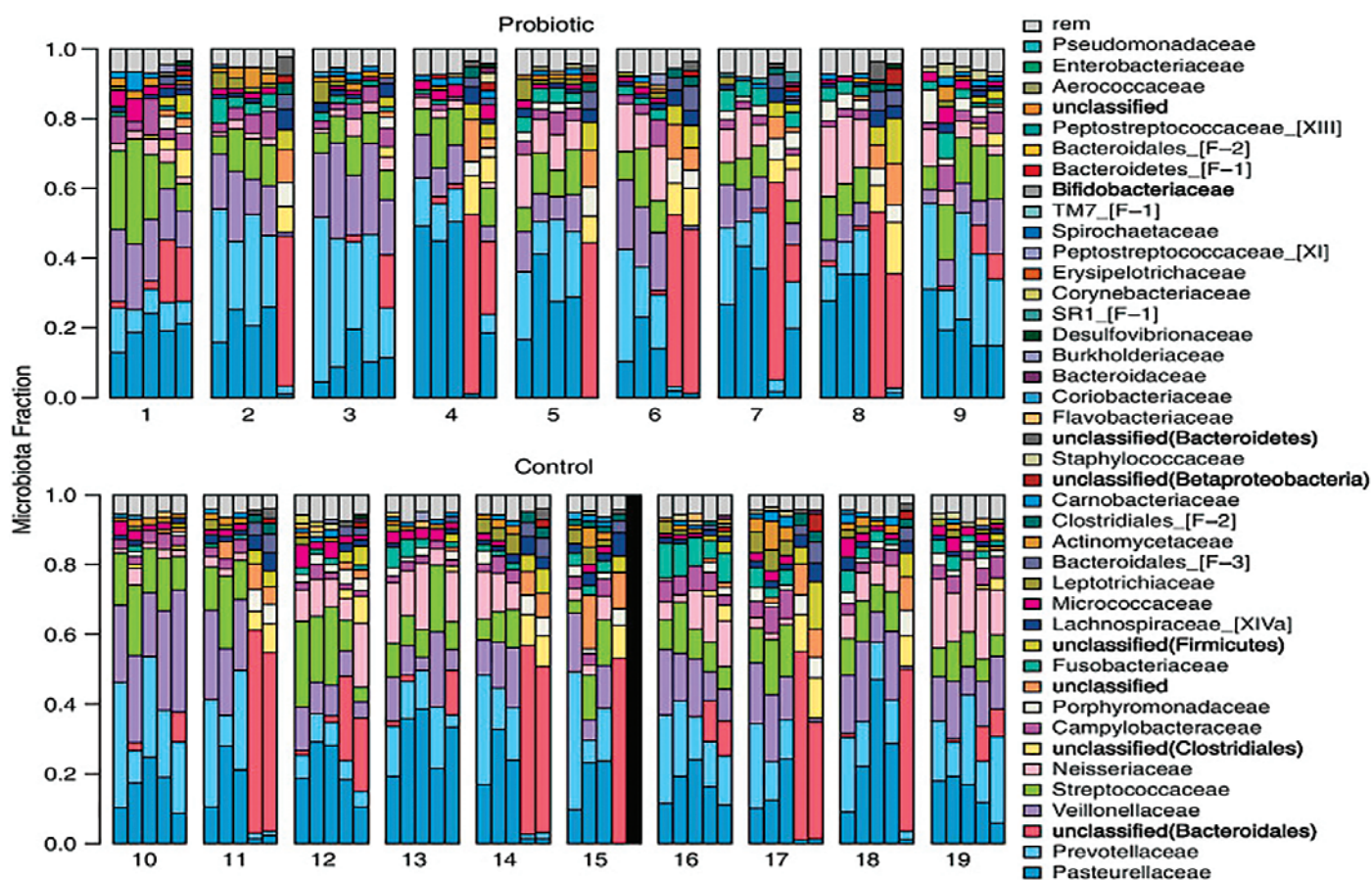
Vzorky slin byly podrobeny sekvenování genu 16S rRNA pomocí platformy Illumina



Obr. 4: Mechanismus redukce IL-8 zprostředkované *S. salivarius* K12.

Uvolňování IL-8 primárními lidskými gingiválními fibroblasty indukované *F. nucleatum* (FN). *S. salivarius* K12 (K12) a různé kulturní supernatanty podávané společně s FN; sterilní filtrovaný supernatant (K12 Sup); frakce supernatantu K12 > 10 kDa (K12 Sup > 10 kDa); supernatantová frakce K12 < 10 kDa (K12 Sup < 10 kDa); extrakt z buněk K12 po zmrazení/rozmrazení (FT); extrakt FT tepelně inaktivovaný při 80°C po dobu 10 minut (extrakt FT + teplo); extrakt FT trávený trypsinem po dobu 10 minut (extrakt FT + trypsin). Vzorky byly analyzovány pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým testem mnohonásobného porovnání s kontrolou

MiSeq. Po filtrování a shlukování sekvenovaných čtení při 97% identitě bylo ve vzorcích slin odebraných testovaným osobám nalezeno 476 OTU s celkovou relativní četností $> 0,01\%$. Do analýzy bylo zahrnuto celkem 2 774 309 sekvenovaných čtení s mediánem $29\,779 \pm 13\,630$ čtení na vzorek. Tyto OTU byly dále shlukovány



Obr. 5: Profily slinné mikroflóry. Bakteriální složení slinné mikroflóry bylo hodnoceno u všech dobrovolníků pomocí sekvenování genu V4 16S rRNA v pěti časových bodech; základní linie, 4 hodiny, 24 hodin, 7 dní a 14 dní. Dobrovolníci dostali žvýkácké tablety obsahující buď *S. salivarius* K12 (horní panel) nebo neprobiotickou kontrolní žvýkačku (spodní panel). Každý sluk pruhů je jeden dobrovolník identifikovaný identifikačním číslem subjektu a každý pruh ve sluku je jednotlivý vzorek slin uspořádaný (zleva doprava) jako: výchozí hodnota, 4 hodiny, 24 hodin, 7 dní a 14 dní. Černý pruh označuje neodebraný vzorek. Barvy odpovídají podílu přiřazené taxonomické rodiny (uvedené v legendě vpravo), seřazené podle celkové relativní abundance od spodní části grafu nahoru. Skupiny sekvencí, které mají ve všech vzorcích méně než 0,05 % relativního výskytu nebo méně než 1 % sekvencí u jednotlivce, jsou seskupeny jako „rem“. Neklasifikované čeledi jsou označeny podle nejnižší klasifikované taxonomické úrovně.

podle taxonomických linií do 38 skupin podle čeledi minimálně s 0,05% relativní četností ve všech vzorcích. Obrázek 5 ukazuje, že nejpočetnější taxonomické čeledi, u nichž bylo zjištěno > 10 % všech klasifikovaných čtení, byly: *Porphyromonadaceae* (17,95 %), *Pasteurellaceae* (15,97 %), *Prevotellaceae* (15,85 %) a *Veillonellaceae* (11,22 %). Při použití PCoA (obr. 6) se vzorky nerozdělily podle skupin (probiotikum versus kontrola) při zkoumání prvních 3 složek (81,01 % celkového rozptylu dat). V průběhu času však dochází ke zřetelnému posunu první složky, přičemž mnoho 7denních a 14denních vzorků se odlišuje od dřívějších časových bodů (obr. 6, spodní řádek).

Tato diferenciací byla rovněž nezávislá na skupině (probiotikum versus kontrola). Pro další zkoumání zjevné změny mikrobioty v závislosti na čase byla vynesena vážená vzdálenost UniFrac všech časových bodů jedinců z obou léčených skupin ve srovnání s jejich výchozím vzorkem před léčbou (obr. 7). Medián vážené vzdálenosti UniFrac se v průběhu léčby zvyšoval, což svědčí o posunu mikrobioty. Zejména podskupina vzorků po 7 a 14 dnech se velmi lišila od ostatních.

Pro testování, zda mezi skupinami existují rozdíly v taxonomickém zastoupení, bylo nutné použít rámec pro analýzu složení dat a k testování významných taxonomických rozdílů mezi skupinami na úrovni čeledí byla použita sada nástrojů ALDEx2. Nebyly zjištěny žádné rozdíly (Benjamini-Hochberg adjustované $p > 0,01$) mezi probiotickou a kontrolní skupinou na začátku ani na konci studie (14 dní), ani mezi těmito skupinami v žádném z dalších časových bodů odběru vzorků. Proto byly léčebné skupiny sloučeny, aby bylo možné testovat rozdíly na konci studie (14 dní) ve srovnání s výchozími hodnotami. U čtyř taxonomických skupin na úrovni čeledí došlo k relativnímu nárůstu relativní četnosti (tabulka 4) a u tří k relativnímu poklesu relativní četnosti (Benjamini-Hochberg adjustované $p < 0,01$ a velikost

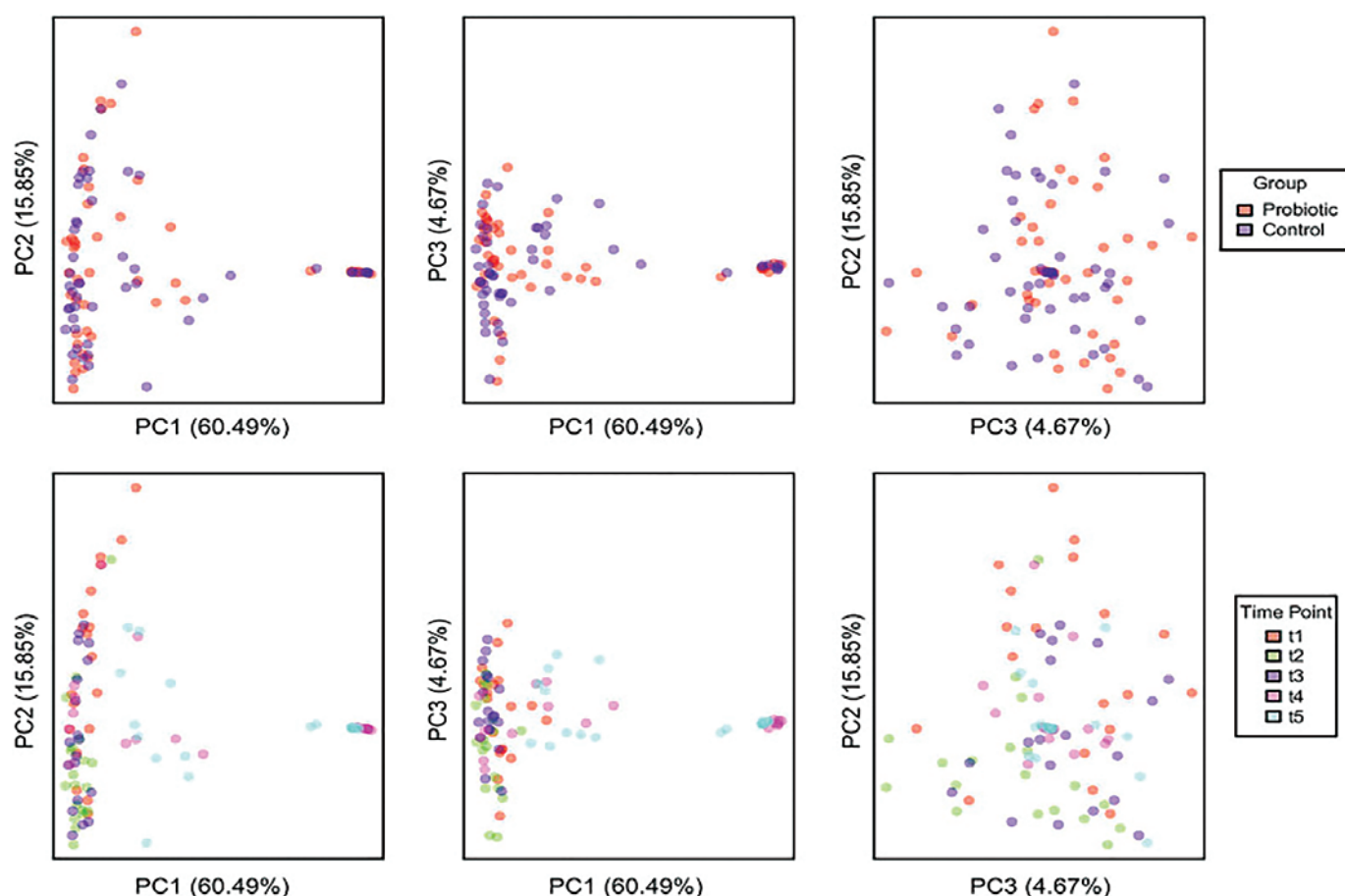
účinku $\geq 1,5$). Zkoumání OTU ve skupinách podle čeledí pomocí algoritmu BLAST oproti HOMDB ukázalo, že většina sekvencí OTU v *Erysipelotrichaceae* byla podobná (> 80 % sekvenční identity) *Erysipelothrix tonsillarum* (HOT_484) nebo *Solobacterium moorei* (HOT_678).

Změny hladin prozánětlivých cytokinů

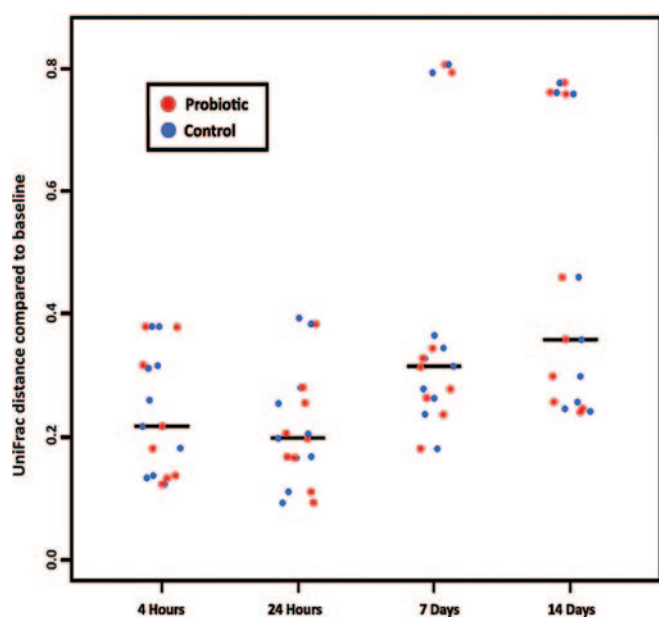
V odebraných slinách devíti osob ve skupině s probiotickými žvýkačkami byly v každém časovém bodě měřeny koncentrace čtyř prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-8 a TNF- α), které souvisejí s onemocněním parodontu. Jednalo se o zdravé jedince bez zjevného onemocnění dutiny ústní, nicméně každý z účastníků měl ve slinách určitou míru těchto zánětlivých cytokinů (obr. 8). Žádný z testovaných cytokinů se v žádném z časových bodů významně nelišil od výchozí kontroly (NS od výchozí hodnoty). V průměru bylo zjištěno 27,27 pg/ml IL-1 β , 8,32 pg/ml IL-6, 426,72 pg/ml IL-8 a 3,27 pg/ml TNF- α . Pro odstranění rozdílu mezi účastníky byl každý subjekt analyzován individuálně, ale nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v profilu cytokinů (údaje nejsou uvedeny).

Diskuse

Schopnost *S. salivarius* K12 a M18 přímo inhibovat růst orálních patogenů je dobře zdokumentována. Nejvýznamnější mechanismus účinku byl připisán megaplasmidům pSsal-K12 a pSsal-M18, které jsou kódovány kmeny *S. salivarius* K12 a M18. Tyto megaplasmidy kódují mnoho bakteriocinů, jako je salivaricin A2 a salivaricin B [20]. Zajímavé je, že *S. salivarius* K12 ani M18 nebyly schopny přímo inhibovat růst orálních patogenů testovaných pomocí testů přímého a odloženého antagonismu, což naznačuje, že inhibice aktivity imunitního systému nebyla spojena



Obr. 6: Grafy PCoA pro všechny vzorky slin na základě vážené vzdálenosti UniFrac. Dvourozměrné grafy PCoA představující první tři složky variability mezi všemi vzorky slin v souboru dat. První složka v této analýze představuje největší vysvětlenou variabilitu v datech (v tomto případě 60,49 %), přičemž další složky představují další největší variabilitu v datech. Vzdálenosti mezi body na grafu vyjadřují, jak podobné jsou si vzorky z hlediska složení mikrobioty a jejího relativního zastoupení. Body na ploše, které jsou si prostorově blíže, jsou si proto taxonomicky podobnější. Horní a dolní řádek grafů jsou shodné, odlišně barevně rozlišené podle proměnné, která je předmětem zájmu (nahore – studijní skupina; dole – časový bod odběru vzorku).



Obr. 7: Změna β -diverzity měřená pomocí váženého UniFracu v čase. Vážená vzdálenost UniFrac každého vzorku mikrobioty slin ve srovnání s výchozím vzorkem daného jedince po 4 h, 24 h, 7 dnech a 14 dnech. Hodnota 0 by znamenala shodné složení mikrobioty mezi vzorky, hodnota 1 by představovala maximální rozdíly v mikrobiotě. Vzorky jsou barevně odlišeny podle studijní skupiny (probiotika červeně; kontrola modře). Čáry představují medián vzdálenosti UniFrac pro daný časový bod. Složení mikrobioty se v průběhu času mění (bez ohledu na studijní skupinu), přičemž u části jedinců se po 7 a 14 dnech mění výrazně.

s usmrcováním cílových organismů bakteriocinem. Tato studie prokázala, že *S. salivarius* K12 a M18 mohou interagovat s dalšími mikroby, o nichž je známo, že způsobují onemocnění v ústní dutině, a ovlivňovat patogenem stimulovanou produkci zánětlivých mediátorů z primárních lidských gingiválních fibroblastů. Ukázalo se, že *S. salivarius* K12 a M18 jsou schopny lépe adharovat k dásňovým fibroblastům než jiná známá probiotická bakterie *L. reuteri* RC-14. Je možné, že tato adherence může soutěžit s orálními patogeny o vhodné vazebné místo. Manning et al. [30] prokázali, že *S. salivarius* K12 a M18 jsou schopny zabránit adherenci pneumokoků na epiteliální buňky hltanu prostřednictvím přímé konkurence o vazebná místa pro pneumokoky. Zajímavé je, že *S. salivarius* K12 i M18 byly schopny přímo inhibovat růst pneumokoků na pevných médiích, ale tento mechanismus nebyl nutný k zabránění adherence pneumokoků. Současná studie nezjišťovala vazbu patogenu na gingivální fibroblasty a zda tomu *S. salivarius* K12 nebo M18 brání. Vzhledem k tomu, že účinná látka byla vylučována do supernatantu a po ošetření trypsinem se stala neúčinnou, lze předpokládat, že to nebyl hlavní mechanismus účinku.

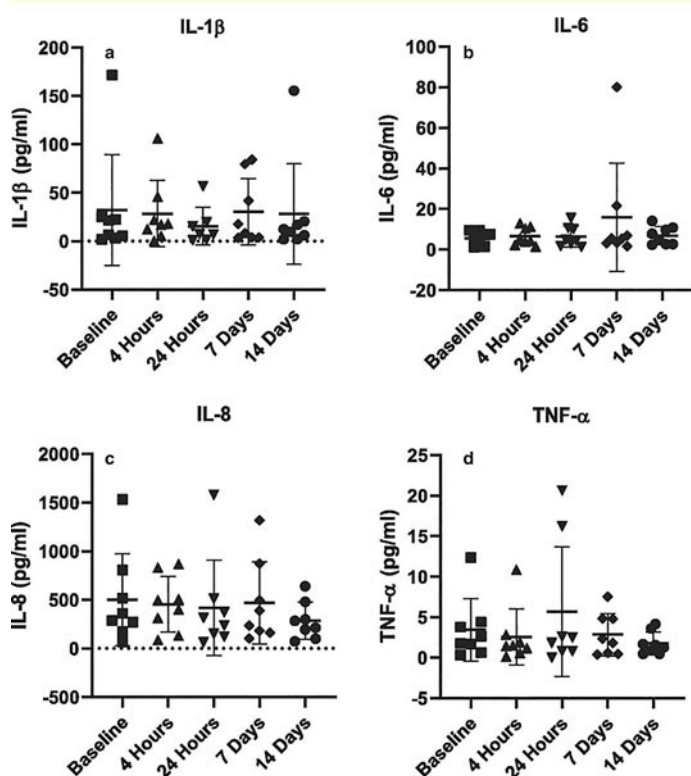
Mnoho druhů streptokoků má prokázané protizánětlivé vlastnosti. Tato studie prokázala, že jak *S. salivarius* K12, tak M18 nebyly schopny vyvolat odpověď IL-6 nebo IL-8 u primárních lidských gingiválních fibroblastů, přestože byly schopny dobře adharovat k této tkáni. Oba kmeny navíc dokázaly inhibovat uvolňování IL-6 a IL-8 vyvolané třemi ústními patogeny, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* a *F. nucleatum* jednotlivě nebo v kombinaci. K této inhibici docházelo bez ohledu na to, zda byly kmeny podávány společně s patogeny, nebo byly dodány před napadením patogeny. Původce byl dále zkoumán a bylo zjištěno, že se jedná o malou bílkovinnou molekulu o velikosti < 10 kDa, která je tepelně stabilní. Tento extrakt byl schopen inhibovat uvolňování IL-8 vyvolané *F. nucleatum* podobně jako současné přidání *S. salivarius* K12.

Tab. 4. Taxonomické skupiny s významnými změnami relativní četnosti

Taxonomická skupina na úrovni čeledi	Wt-BH†	Velikost účinku‡
Relativní nárůst		
Firmicutes; Erysipelotrichia; Erysipelotrichales; Erysipelotrichaceae	1,85E-08	2,04
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae2	4,48E-08	1,87
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Bacteroidaceae	5,25E-06	1,57
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae	6,86E-07	1,51
Relativní pokles		
Fusobacteria; Fusobacteria; Fusobacteriales; Leptotrichiaceae	1,39E-05	- 1,77
Actinobacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Actinomycetaceae	1,74E-05	- 1,61
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae	1,34E-05	- 1,51

†Korigovaná p-hodnota z párového Welchova t-testu s použitím Benjamini-Hochbergova postupu [33].

‡Medián velikosti účinku odhadnutý pomocí ALDEx2.



Obr. 8: Hladiny prozánětlivých cytokinů ve slinách dobrovolníků žvýkajících probiotické tablety. Koncentrace (pg/ml) IL-1β (a); IL-6 (b); IL-8 (c); TNF-α (d) ve vzorcích slin odebraných zdravým dobrovolníkům žvýkajícím probiotickou žvýkačku na začátku, po 4 hodinách, 24 hodinách, 7 dnech a 14 dnech. Hladiny cytokinů byly stanoveny pro každý vzorek zvlášť, přičemž byla uvedena průměrná koncentrace pro všechny jedince. Vzorky byly analyzovány pomocí jednocestné analýzy ANOVA s opakovanými měřeními a Tukeyho testem mnohonásobného srovnání. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Chybové úsečky představují standardní chybu průměru ±

Druh bakterie *Streptococcus mutans* byl dlouho považován za primárního etiologického původce zubního kazu [35]. V jiných studiích bylo zjištěno, že *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola* (společně označované jako „červený komplex“) jsou úzce spojeny s onemocněním parodontu [36]. Studie využívající vysoce výkonné sekvenční techniky však ukázaly, že tyto předpoklady jsou příliš zjednodušené, protože onemocnění jsou často polymikrobiální povahy [37, 38] a u jednotlivých jedinců se liší v přítomnosti mikrobů, přičemž různé bakterie způsobují stejné klinické projevy [38]. Kromě toho ne všechny mikroorganismy mají negativní vliv na zdraví, protože široká škála druhů včetně členů čeledi *Pasteurellaceae* a *Prevotellaceae* je běžnou součástí zdravé i nemocné ústní dutiny [39, 40]. Proto je důležité zajistit, aby přípravek obsahující *S. salivarius* určený pro ústní dutinu neměl negativní vliv na přítomný přirozený mikrobiom ani na homeostatické zánětlivé prostředí.

Aplikace probiotické žvýkačky v denním dávkovacím režimu po dobu sedmi dnů, po níž následovalo další sedmidenní vymývací období, nezměnila profily mikrobioty zdravých dobrovolníků, jak bylo prokázáno u probiotického jogurtu a střevní mikrobioty [41]. Do 14. dne došlo k posunu v profilu mikrobioty u několika účastníků; tento posun však nebyl závislý na tom, zda osoba užívala probiotikum, nebo kontrolní dávku placeba. To bylo překvapivé, protože to naznačuje, že pravidelné používání žvýkaček může mít vliv na slinnou mikrobiotu u části populace, což je v rozporu s Takeuchi et al. [42] a Söderling et al. [43], kteří neprokázali žádnou změnu mikrobioty při pravidelném používání žvýkaček; studované populace však byly výhradně muži a děti. Zúžení designu studie na tyto specifické skupiny může být důvodem, proč nebyla pozorována žádná významná pozorování, ale bylo by třeba provést další studie.

Přídavek *S. salivarius* K12 ve skupině s probiotickou žvýkačkou nevyšel relativní podíl *Streptococcaceae* ve srovnání s kontrolní skupinou. Protože *S. salivarius* je převládajícím komenzálním streptokokem v ústní dutině [6], lze předpokládat, že měřenou populaci *Streptococcaceae* tvořil převážně *S. salivarius*. Dodatečná konzumace *S. salivarius* K12 také nezměnila přirozenou imunitní rovnováhu v ústech, což ukazuje, že tato terapie může být užitečná, aniž by poškodila přirozené prostředí. *S. salivarius* se často nachází na hřbetním povrchu jazyka, a proto by se v subgingiválních místech, kde patogeny způsobují především záněty vedoucí k onemocnění, neměl vyskytovat ve velkém množství. Naštěstí by efektor identifikovaný v této studii byl schopen získat přístup k těmto místům, pokud by byl uvolněn do slin.

Závěr

Tato studie prokázala, že *S. salivarius* K12 a M18 jsou schopny produkovat malou proteinovou molekulu schopnou inhibovat aktivaci IL-6 a IL-8 primárních lidských gingiválních fibroblastů patogeny parodontálních onemocnění. Tato molekula však nebyla bakteriocinem a nebyla schopna inhibovat růst těchto patogenů. Studie rovněž prokázala, že současné podávání efektoru a patogenu není nutné a že *S. salivarius* lze aplikovat před expozicí patogenu. Toto podání nemění přirozenou slinnou mikroflóru ani nestimuluje imunitní reakci. To ukazuje, že *S. salivarius* by si zasloužil další studii na populaci s predispozicí k parodontálnímu onemocnění.

Zkratky

CBA: Columbia blood agar (kolumbijský krevní agar); CFU: Colony forming units (jednotky tvořící kolonie); MEM: Minimum essential medium (minimální základní médium); OD600: Optical density measure at 600 nm (optická hustota měřená při 600 nm); OTU: Operational taxonomic units (operační taxonomické jednotky); PBS: Phosphate-buffered saline (fosfátem pufovaný fyziologický roztok); PCoA: Principal component analysis (analýza hlavních komponent).

Poděkování: *S. salivarius* K12 a M18, *C. albicans* TIMM 1768 a devět standardních indikátorových kmenů (I1 až I9) bylo laskavě poskytnuto z laboratorní sbírky dr. J. R. Tagga (University of Otago, Dunedin, Nový Zéland). Děkuje společnosti Prairies Natural za dodání probiotických žvýkaček Cultured Care K12.

Příspěvky autorů: Experimenty navrhli a koncipovali KWM, PAC, GR a JPB. Experimenty prováděl KWM, analyzoval je KWM, RMC a JMM. Obrázky a tabulky vytvořili KWM, RMC a JMM. Rukopis vypracovali KWM, RMC a JPB a kriticky jej posoudili KWM, RMC, JMM, PAC, GR a JPB. Všichni autoři si přečetli a schválili konečnou verzi rukopisu.

Financování: Tento výzkum byl částečně financován Nadací W. Garfielda Westona pro JPB a Kanadským institutem pro výzkum zdraví (CIHR) Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarship a Ontario Graduate Scholarship pro KWM. Žádný z financujících orgánů se nepodílel na návrhu studie, sběru, analýze, interpretaci dat ani na psaní rukopisu.

Dostupnost údajů a materiálů: Údaje pro tuto studii jsou k dispozici na vyžádání u odpovídajícího autora. Části tohoto rukopisu obsahují údaje uvedené v práci KWM, která je volně dostupná na adrese <http://ir.lib.uwo.ca/etd/2816>.

Prohlášení

Etické schválení a souhlas s účastí - Studie byla schválena etickou komisí pro výzkum v oblasti zdravotnictví na University of Western Ontario (REB 104641) a komisí pro dopady klinického výzkumu v Lawson Health Research Institute (R-13-523). Všichni účastníci podepsali souhlasné prohlášení.

Konkurenční zájmy - Autoři nemají žádné konkurenční zájmy.

Podrobnosti o autorovi: ¹Department of Microbiology and Immunology, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, Londýn, Ontário, Kanada. ²Kanadské centrum pro výzkum lidského mikrobiomu a probiotik, Lawson Health Research Institute, Londýn, Ontário, Kanada. ³Department of Biochemistry, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, Londýn, Ontário, Kanada. ⁴School of Health Sciences, Fanshawe College, Londýn, Ontário, Kanada. ⁵Department of Surgery, Division of Urology, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario, Londýn, Ontário, Kanada.

Přijato: 23. června 2020 Akceptováno: 29. dubna 2021

Literatura

- Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck GDRP. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res*. 2012;91(10):914–20.
- Liu B, Fallner LL, Klitgord N, Mazumdar V, Ghodsi M, Sommer DD, et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e37919.
- Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol*. 2000;1994(5):78–111.
- Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(3):248–66.
- Petersen PE. World Health Organization global policy for improvement of oral health—World Health Assembly 2007. *Int Dent J*. 2008;58(3):115–21.
- Wescombe PA, Heng NC, Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR. Streptococcal bacteriocins and the case for Streptococcus salivarius as model oral probiotics. *Future Microbiol*. 2009;4(7):819–35.
- Roslund MI, Puhakka R, Grönroos M, Nurminen N, Oikarinen S, Gazali AM, et al. Biodiversity intervention enhances immune regulation and health-associated commensal microbiota among daycare children. *Sci Adv*. 2020;6(42):eaba2578.
- Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer R-JM, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(6):G851–9.
- Qin H, Zhang Z, Hang X, Jiang YL. plantarum prevents enteroinvasive Escherichia coli-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2009;9:63.
- Crittenden RG, Martinez NR, Playne MJ. Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2003;80(3):217–22.
- Morishita T, Tamura N, Makino T, Kudo S. Production of menaquinones by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci*. 1999;82(9):1897–903.
- Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(1):27–38.
- Walker WA. Mechanisms of action of probiotics. *Clin Infect Dis*. 2008;46(Suppl 2):S87–91 (discussion S144–51).
- Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 2007;132(2):562–75.
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(2 Suppl):444S–S450.
- Teughels W, Durukan A, Ozelik O, Pauwels M, Quirynen M, Hayat MC. Clinical and microbiological effects of Lactobacillus reuteri probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2013;40(11):1025–35.
- Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with Lactobacillus salivarius WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008;35(10):897–905.
- Burton JP, Wescombe PA, Cadieux PA, Tagg JR. Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci? *Benef Microbes*. 2011;2(2):93–101.

- Wescombe PA, Burton JP, Cadieux PA, Klesse NA, Hyink O, Heng NC, et al. Megaplasms encode differing combinations of antibiotics in Streptococcus salivarius. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;90(3):269–80.
- Hyink O, Wescombe PA, Upton M, Ragland N, Burton JP, Tagg JR. Salivarin A2 and the novel antibiotic salivarin B are encoded at adjacent loci on a 190-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain Streptococcus salivarius K12. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(4):1107–13.
- Heng NC, Haji-Ishak NS, Kalyan A, Wong AY, Lovric M, Bridson JM, et al. Genome sequence of the bacteriocin-producing oral probiotic Streptococcus salivarius strain M18. *J Bacteriol*. 2011;193(22):6402–3.
- Burton JP, Chilcott CN, Wescombe PA, Tagg JR. Extended safety data for the oral cavity probiotic Streptococcus salivarius K12. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2010;2(3):135–44.
- Burton JP, Cowley S, Simon RR, McKinney J, Wescombe PA, Tagg JR. Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic Streptococcus salivarius K12: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2011;49(9):2356–64.
- Burton JP, Wescombe PA, Moore CJ, Chilcott CN, Tagg JR. Safety assessment of the oral cavity probiotic Streptococcus salivarius K12. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72(4):3050–3.
- Burton JP, Wescombe PA, Macklaim JM, Chai MH, Macdonald K, Hale JD, et al. Persistence of the oral probiotic Streptococcus salivarius M18 is dose dependent and megaplasmid transfer can augment their bacteriocin production and adhesion characteristics. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e65991.
- Horz HP, Meinelt A, Houben B, Conrads G. Distribution and persistence of probiotic Streptococcus salivarius K12 in the human oral cavity as determined by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(2):126–30.
- Di Piero F, Adami T, Rapacioli G, Giardini N, Streitberger C. Clinical evaluation of the oral probiotic Streptococcus salivarius K12 in the prevention of recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by Streptococcus pyogenes in adults. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(3):339–43.
- Di Piero F, Donato G, Fomia F, Adami T, Careddu D, Cassandro C, et al. Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic Streptococcus salivarius K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by Streptococcus pyogenes and recurrent acute otitis media. *Int J Gen Med*. 2012;5:991–7.
- Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, Tagg JR, Thomson WM, Hale JD, et al. Influence of the probiotic Streptococcus salivarius strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Microbiol*. 2013;62(Pt 6):875–84.
- Manning J, Dunne EM, Wescombe PA, Hale JDF, Mulholland EK, Tagg JR, et al. Investigation of Streptococcus salivarius-mediated inhibition of pneumococcal adherence to pharyngeal epithelial cells. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):225.
- Kaci G, Goudercourt D, Dennin V, Pot B, Dore J, Ehrlich SD, et al. Anti-inflammatory properties of Streptococcus salivarius, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(3):928–34.
- Kaci G, Lakhdari O, Dore J, Ehrlich SD, Renault P, Blottiere HM, et al. Inhibition of the NF-kappaB pathway in human intestinal epithelial cells by commensal Streptococcus salivarius. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(13):4681–4.
- Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, Gardy JL, Chikatamarla A, Gellatly S, et al. The commensal Streptococcus salivarius K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun*. 2008;76(9):4163–75.
- Sliepen I, Van Damme J, Van Essche M, Loozen G, Quirynen M, Teughels W. Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *J Dent Res*. 2009;88(11):1026–30.
- Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:92.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
- Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294–303.
- Schwarzberg K, Le R, Bharti B, Lindsay S, Casaburi G, Salvatore F, et al. The personal human oral microbiome obscures the effects of treatment on periodontal disease. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86708-e.
- Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009;9:259.
- Yang F, Feng X, Ning K, Liu K-L, Lo C-C, Wang W, et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J*. 2012;6(1):1–10.
- McNulty NP, Yatsunenko T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med*. 2011;3(106):106ra-ra.
- Takeuchi K, Asakawa M, Hashiba T, Takeshita T, Saeki Y, Yamashita Y. Effects of xylitol-containing chewing gum on the oral microbiota. *J Oral Sci*. 2018;advpub.
- Söderling E, ElSalhy M, Honkala E, Fontana M, Flannagan S, Eckert G, et al. Effects of short-term xylitol gum chewing on the oral microbiome. *Clin Oral Invest*. 2015;19(2):237–44.

© Autor (autoři) 2021. Otevřený přístup: Tento článek je licencován pod mezinárodní licenci Creative Commons Attribution 4.0, která povoluje použití, sdílení, adaptaci, distribuci a reprodukci v libovolném médiu nebo formátu, pokud uvedete odkaz na původního autora (původní autory) a zdroj, odkaz na licenci Creative Commons a uvedete, zda byly provedeny změny. Obrázky nebo jiné materiály třetích stran v tomto článku jsou zahrnuty v licenci Creative Commons k článku, pokud není v materiálu v záznamu o autorských právech uvedeno jinak. Pokud materiál není zahrnut v licenci Creative Commons a vaše zamýšlené použití není povoleno zákonnými předpisy nebo překračuje povolené použití, musíte získat povolení přímo od držitele autorských práv. Chcete-li si prohlédnout kopii této licence, navštivte <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Zřeknutí se věnování ve veřejné doméně Creative Commons (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) se vztahuje na data zpřístupněná v tomto článku, pokud není v záznamu o autorských právech u dat uvedeno jinak.

INHIBIČNÍ ÚČINKY *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* K12 NA TVORBU KARIOGENNÍHO BIOFILMU

Hye-Ji Kim - Department of Dental Hygiene, College of Health Science, Dankook University, Cheonan, Korejská republika Hyun-Jun Yoo
Hyun-Jun Yoo - Department of Preventive Dentistry, College of Dentistry, Dankook University, Cheonan, Korejská republika

Abstrakt

Souvislosti/účel: *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) K12 je známá probiotická bakterie. Cílem této studie bylo prozkoumat antikariogenní účinky *S. salivarius* K12 na kariogenní biofilm.

Materiál a metody: *S. salivarius* K12 byl kultivován v bujonu M17. Byla zkoumána antimikrobiální aktivita použitého kultivačního média (SCM) proti *Streptococcus mutans*. *S. salivarius* K12 byl kultivován společně se *S. mutans* pomocí membránové vložky. Při tvorbě biofilmu pomocí slinných bakterií a *S. mutans* byl K12 inokulován každý den. Biomasa biofilmu byla zkoumána pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Z biofilmu byla také extrahována bakteriální DNA a poté byl podíl bakterií analyzován pomocí kvantitativní PCR pomocí specifických primerů. Expresí *gtf* genů *S. mutans* v biofilmu se *S. salivarius* K12 nebo bez něj byla analyzována pomocí RT-PCR.

Výsledky: SCM *S. salivarius* K12 inhiboval růst *S. mutans*. *S. salivarius* K12 také snižoval růst *S. mutans* při společné kultivaci. Tvorba kariogenního biofilmu byla snížena přidáním *S. salivarius* K12 a počet *S. mutans* v biofilmu byl rovněž snížen v přítomnosti *S. salivarius* K12. Expresí *gtfB*, *gtfCa* *gtfD* *S. mutans* v biofilmu byla snížena v přítomnosti *S. salivarius* K12.

Závěr: *S. salivarius* K12 může inhibovat tvorbu kariogenního biofilmu přerušáním růstu a produkce glukosyltransferázy *S. mutans*.

© 2022 Association for Dental Sciences of the Republic of China. Vydavatelské služby společnosti Elsevier B.V. Jedná se o článek s otevřeným přístupem pod licencí CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Úvod

Zubní kaz je fenomén demineralizace povrchu zubu působením kyselin a úzce souvisí s kariogenními bakteriemi, jako jsou *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) a druhy *Lactobacillus*, které se vyznačují intenzivní produkcí kyselin a aciditou.¹ Zejména *S. mutans* se považuje za bakterii, která má větší vztah k zubnímu kazu, a to spíše kvůli svému působení v mikrobiálním ekosystému v ústní dutině než kvůli vlastnostem této bakterie samotné. *S. mutans* produkuje glukany rozpustné ve vodě nebo nerozpustné ve vodě ze sacharózy pomocí glukosyltransferáz (*Gtf*) a hraje důležitou roli ve vývoji biofilmu na povrchu zubu prostřednictvím produkce glukanu.^{2,3} Kromě toho ve vzniklém orálním biofilmu vytváří *S. mutans* silně kyselé prostředí uvnitř biofilmu svou kontinuální produkcí kyselin v podmínkách bohatých na cukry.^{3,4} Toto prostředí s nízkým pH zvyšuje růst acidurických bakterií jako kariogenních bakterií a proliferace nemutanových streptokoků byla potlačena.⁵ Delší trvání nízkého pH vede k demineralizaci zubu, což nakonec vyvolává vznik zubního kazu.

Streptococcus salivarius (*S. salivarius*) K12 je časným kolonizátorem v mikrobiální ekologii ústní dutiny a je druhem izolovaným ze stěrů jazyka.⁶ Kmen K12 produkuje bakteriociny a jeho bezpečnost byla prokázána v testech na lidských a zvířecích modelech.^{7,8} Proto je tato bakterie považována za probiotickou bakterii. Probiotika jsou známá jako „živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství přinášejí hostiteli zdravotní prospěch“, a byly pokusy využít probiotika k prevenci a léčbě lidských onemocnění. Mezi probiotiky je *S. salivarius* K12, který vylučuje dva bakteriociny, jako je salivaricin A2 a B.¹⁰ Protože *S. salivarius* K12 je izolován z ústní dutiny a vylučuje antibakteriální látky, je lépe použitelný na bakteriální onemocnění ústní dutiny než jiná probiotika.

Cílem této studie bylo zjistit antikariogenní účinky *S. salivarius* K12 na kariogenní biofilm obsahující *S. mutans* a vliv kmene K12 na faktory související s tvorbou biofilmu *S. mutans*.

Materiály a metody

Bakteriální kmen a kultivační podmínky

S. salivarius K12 byl laskavě darován společností Green store Inc. (Bactoblis; Seongnam, Gyeonggi, Korea) a použit v této studii. Bakterie byla kultivována v bujonu M17 (BD bioscience, Sparks, MD, USA) doplněném 1% glukózou, aby se s ní dalo hospodařit a vytvořit bakteriální zásobu. Za účelem zkoumání antimikrobiální aktivity *S. salivarius* K12 byly *S. salivarius* a *S. mutans* ATCC 25175 kultivovány v tryptickém sójovém bujonu (BHI; BD bioscience).

Antimikrobiální aktivita *S. salivarius* K12 proti *S. mutans*

Antibakteriální aktivita *S. salivarius* K12 proti *S. mutans* byla hodnocena pomocí minimální inhibiční koncentrace mikrodiluční metodou podle metod doporučených Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).¹¹ Mililitr *S. salivarius* (1×10^7 bakterií/ml) byl naočkován do 10 ml bujonu M17 a bakteriální suspenze byla inkubována 24 hodin v aerobních podmínkách. Suspenze K12 byla odstředována při $5\,000 \times g$ po dobu 10 minut a supernatant byl přenesen do nové 15ml kónické zkumavky (SPL Life Sciences, Gyeonggi, Korea). Supernatant byl filtrován polyvinylidenfluoridovým filtrem (Millipore, Billerica, MA, USA). Přefiltrovaný supernatant jako použité kultivační médium (SCM) byl použit ke stanovení citlivosti. Do 96jamkové destičky (SPL Life Sciences) bylo nadávkováno 180 ml bujonu M17. SCM bylo přidáno do 1. jamky obsahující čerstvé médium a bylo provedeno 2násobné sériové ředění do 11. sloupce. *S. mutans* byly počítány pomocí bakteriální počítací komory (Hausser Scientific, Horsham, PA, USA) a upraveny na 2×10^6 bakterií/ml čerstvým bujonem M17. Připravená suspenze *S. mutans* (20 ml) byla naočkována do jamky obsahující smíšené médium. Destička byla inkubována při teplotě 37 °C v aerobním inkubátoru. Růst bakterií byl měřen pomocí optické hustoty při vlnové délce 660 nm na mikroděstičkovém snímači (BioTek, Winooski, VT, USA). V dalším experimentu byly *S. mutans* (1×10^6 bakterií/ml) a *S. salivarius* K12 (1×10^7 bakterií/ml nebo 1×10^8 bakterií/ml) společně kultivovány pomocí Transwell™ (velikost pórů 0,4 mm; Corning Co., Corning, NY, USA) ve 12jamkové destičce. Bakteriální suspenze *S. mutans* a *S. salivarius* byla inokulována do vnitřní, respektive do vnější části Transwell™ a destička byla inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin. Růst *S. mutans* byl měřen optickou hustotou při vlnové délce 660 nm a obraz *S. mutans* byl pořízen CMOS kamerou mikroskopu s fázovým kontrastem (Nikon Co., Tokio, Japonsko).

Tvorba a pozorování biofilmu

Biofilm byl vytvořen metodou, kterou uvádí Lee SH.³ Pro vytvoření pelikuly na destičce byly nejprve odebrány nestimulované sliny od 10 zdravých osob a shromážděné sliny byly odstředovány při $7\,000 \times g$ po dobu 10 minut při 4 °C, aby se odstranily zbytky a bakterie. Připravené sliny byly dávkovány do 12jamkové polystyrenové destičky (SPL Life Sciences) a 8jamkového kultivačního sklíčka (Corning Co.) a sušeny v suché sušárně při 40 °C. Tento krok byl opakován 5krát. Destičky byly sterilizovány UV zářením. Za účelem vytvoření slinného biofilmu byly smíchány sliny s bujonem BHI obsahujícím 2 % sacharózy a 1 % manózy a vortexovány po dobu 20 s. Do směsi se slinami a bujonem BHI byly přidány *S. mutans* (1×10^6 bakterií/ml) za účelem vytvoření kariogenního biofilmu a připravená suspenze byla inokulována do slinami pokryté 12jamkové destičky a 8jamkového kultivačního sklíčka. Destičky byly inkubovány v aerobních podmínkách po dobu 7 dnů a média

byla měněna každý den. Pro zkoumání vlivu *S. salivarius* na biofilm bylo při tvorbě kariogenního biofilmu každý den inokulováno sto mikrolitrů suspenze *S. salivarius* K12 (1×10^8 a 1×10^9 bakterií/ml) s výměnou média za čerstvé. Biofilm byl třikrát promyt fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (PBS, pH 7,2) a do 12jamkové destičky s biofilmem byl přidán bujon BHI (1 ml). Biofilmy byly rozrušeny škrabkou (Corning Co.) a suspenze biofilmu byly přeneseny do 1,5ml zkumavky.

Tabulka 1 Sekvence primerů pro PCR v reálném čase.

Gen	Sekvence primerů	
Univerzální	Přední	50-TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A-30
	Zadní	50-TGC GGG ACT TAA CCC AAC A-30
<i>Streptococcus</i> spp	Přední	50-AAG CAA CGC GAA GAA CCT TA-30
	Zadní	50-GTC TCG CTA GAG TGC CCA AC-30
<i>S. mutans</i>	Přední	50-CTA CAC TTT CGG GTG GCT TG-30
	Zadní	50-GAA GCT TTT CAC CAT TAG AAG CTG-30
<i>S. salivarius</i>	Přední	50-TTG CCA CAT CTT CAC TCG CTT-30
	Zadní	50-GTT TAG TAG CAA CTT CTG GCT T-30
gtfB	Přední	50-AGC AAT GCA GCC AAT CTA CAA AT-30
	Zadní	50-ACG AAC TTT GCC GTT ATT GTC A-30
gtfC	Přední	50-CTC AAC CAA CCG CCA CTG TT-30
	Zadní	50-GGT TAA CGT CAA AAT TAG CTG TAT TAG C-30
gtfD	Přední	50-CAC AGG CAA AAG CTG AAT TAC A-30
	Zadní	50-GAT GGC CGC TAA GTC AAC AG-30
recA	Přední	50-CTA ATT CAC CTG TAC GAG-30
	Zadní	50-CCG AAT CTT CTG TAA G-30

gtfB: glukosyltransferáza B, gtfC: glukosyltransferáza C, gtfD: glukosyltransferáza D, recA: rekombináza A.

Po 30sekundovém vortexování byly suspenze desetkrát naředěny bujonem BHI na 106. Naředěné suspenze byly rozetřeny na agarovou desku Mitissalivarius a na agarovou destičku Mitissalivarius bacitracin (BD bioscience) pro počítání orálních streptokoků a *S. mutans*. Destičky byly inkubovány při 37 °C po dobu 48 hodin a byly spočítány kolonie orálních streptokoků a *S. mutans*. V dalším experimentu byl biofilm na sklíčku s 8 jamkami třikrát promyt PBS a obarven pomocí soupravy Live/dead bacterial viability kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA) během 1 hodiny při pokojové teplotě. Po promytí PBS byl biofilm pozorován konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem (CLSM) (LSM 700; Carl-Zeiss, Oberkochen, Německo). Pro 3D skenování biofilmu bylo provedeno z-skenování (0–30 mm) a snímky biofilmu byly analyzovány programem ZEN (Carl-Zeiss). Pro měření hmotnosti biofilmu byl po uložení každého snímku 3D obrazu změřen rozměr fluorescence (bakterií) na každém snímku pomocí softwaru ImageJ (National Institutes of Health, NY, USA). Procento bakteriální biomasy v každém snímku bylo kalibrováno korelací rozměru obrazu (160 mm × 160 mm) a každá úroveň snímků byla sečtena pro výpočet hmotnosti biofilmu.

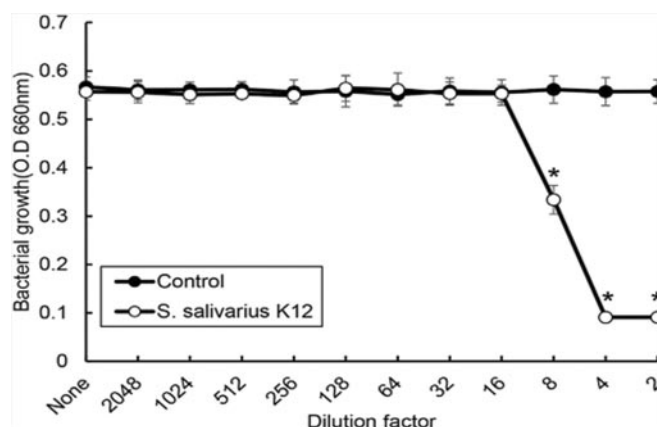
Zkoumání podílu bakterií v biofilmu

Pro zkoumání podílu bakterií v biofilmu byl biofilm vytvořen s *S. salivarius* K12 nebo bez něj metodou 2.3. Tvorba a pozorování biofilmu, celková bakteriální DNA byla extrahována pomocí soupravy pro extrakci bakteriální genomové DNA (iNtRON biotechnology, Gyeonggi, Korea). Pro vytvoření standardní křivky byly *S. mutans* a *S. salivarius* spočítány v bakteriální počítací komoře (Hausser Scientific) a 1×10^7 bakterií/ml bakterií bylo sériově naředěno na 10^5 . Každá naředěná bakteriální suspenze byla sklízena centrifugací při 7 000× g po dobu 10 minut a supernatant byl odstraněn. Genomová DNA z bakteriálních pelet byla extrahována pomocí soupravy. Extrahovaná DNA (4 ml) byla smíchána s 25 ml 2× TB Green™ premix ExTaq™ (Takara Co., Kyoto, Japonsko), 0,2 mM každého primeru, referenčním barvivem

ROX a destilovanou vodou do celkového objemu 50 ml. Směs byla podrobena PCR s 10minutovým krokem denaturace templátu při 94 °C a 40 cykly amplifikačního kroku (denaturace při 95 °C po dobu 10 s, žihání při 60 °C po dobu 10 s a extenze při 72 °C po dobu 33 s) pomocí systému 7500 real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primery pro PCR v reálném čase jsou uvedeny v tabulce 1. Hladina bakterií byla vypočtena pomocí kritického prahového cyklu (Ct) a porovnána s vytvořenou standardní křivkou z hodnot Ct a standardního počtu bakterií.

Změna virulentního faktoru *S. mutans* pomocí *S. salivarius* K12

Celková RNA z bakterií v biofilmu byla extrahována pomocí soupravy pro izolaci bakteriální RNA TRIzol® Max (Invitrogen Life Tech, Carlsbad, CA) podle doporučeného protokolu výrobce.



Obr. 1: antibakteriální aktivita *S. salivarius* K12 proti *S. mutans*. Po odebrání použitého kultivačního média ze *S. salivarius* K12 byl *S. mutans* kultivován v různých koncentracích SCM a růst bakterií byl měřen optickou hustotou pomocí spektrofotometru. Experiment byl proveden třikrát ve dvou opakováních a údaje jsou uvedeny jako průměrná směrodatná odchylka. * (hvězdička) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou.

cDNA byla syntetizována pomocí následujících genově specifických primerů: 50-CAT AAG GCG TTA ATT TCC CTT CA-3 pro gtfB, 5-CCT GTG AAG TTA GCT TGC TAT TG-3 pro gtfC a 5-ATA GGC TGT CTT ATC GCT GTT GCT A-3 pro gtfD.¹² Celkem 1 mg celkové RNA, 2 mM primerů specifických pro daný gen, 10 mM směsi dNTA a 200 USUperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bylo smícháno a směs byla inkubována při 50 °C po dobu 10 minut a zahřívána při 80 °C po dobu 10 minut pro inaktivaci reakce. cDNA byly smíchány s 10 ml 2× TB Green™ premix ExTaq™ (Takara Co.), 0,4 mM každého primeru, referenčním barvivem ROX a destilovanou vodou do celkového objemu 20 ml. Směs byla podrobena PCR s 5minutovým krokem denaturace templátu při 95 °C a 40 cykly amplifikačního kroku (denaturace při 95 °C po dobu 10 s, žihání při 60 °C po dobu 10 s a extenze při 72 °C po dobu 33 s) pomocí systému 7500 real-time PCR (Applied Biosystems). Produkty PCR byly zkoumány pro každý specifický amplifikační produkt pomocí teploty tání. Primery pro PCR v reálném čase jsou uvedeny v tabulce 1, gen recA byl použit jako housekeepingový gen.^{12,13}

Statistická analýza

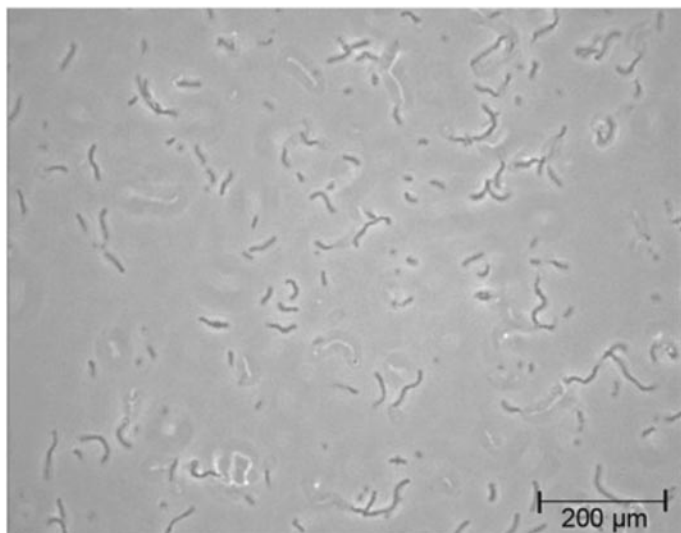
Rozložení dat bylo zkoumáno pomocí Kolmogorov–Smirnovova testu. Významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly analyzovány pomocí Kruskal–Wallisova testu a Mann–Whitneyho U testu s použitím IBM SPSS statistics Ver. 23 (IBM, Armonk, NY, USA). Hodnoty P menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

Výsledky

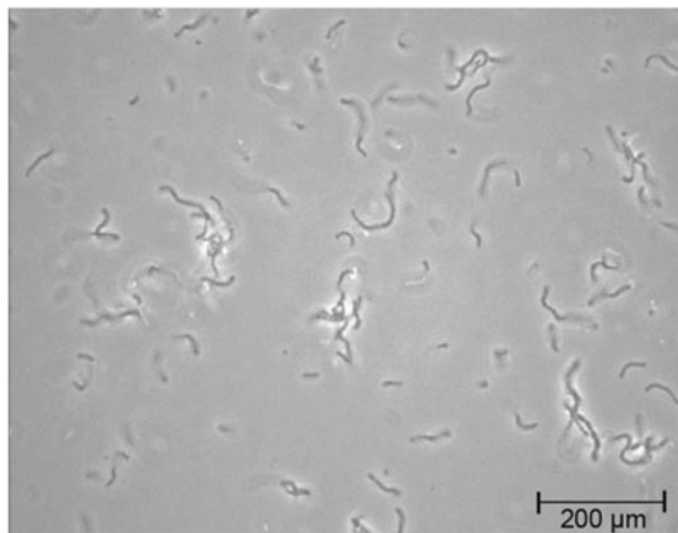
Antibakteriální aktivita *S. salivarius* K12 proti *S. mutans*

V antibakteriálním experimentu s použitím *S. salivarius* K12 byl růst *S. mutans* významně inhibován při 8násobném ředění SCM a zcela inhibován nad 4násobným ředěním SCM ($P < 0,05$) (obr. 1). Dále byla za účelem zkoumání antibakteriální

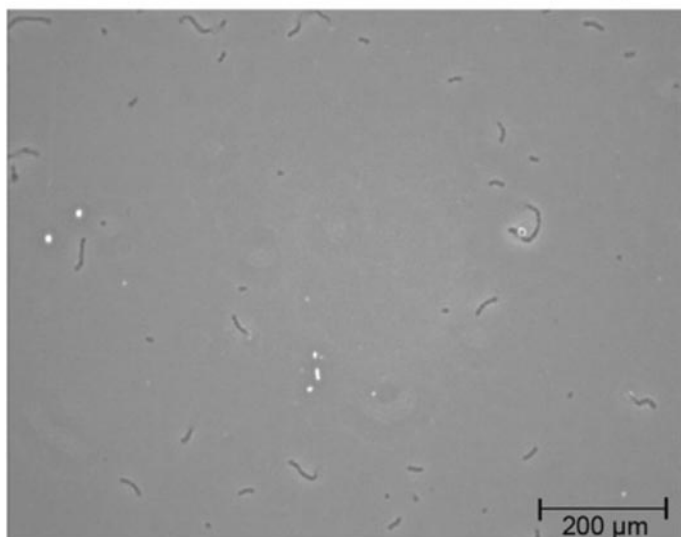
A. *S. mutans*



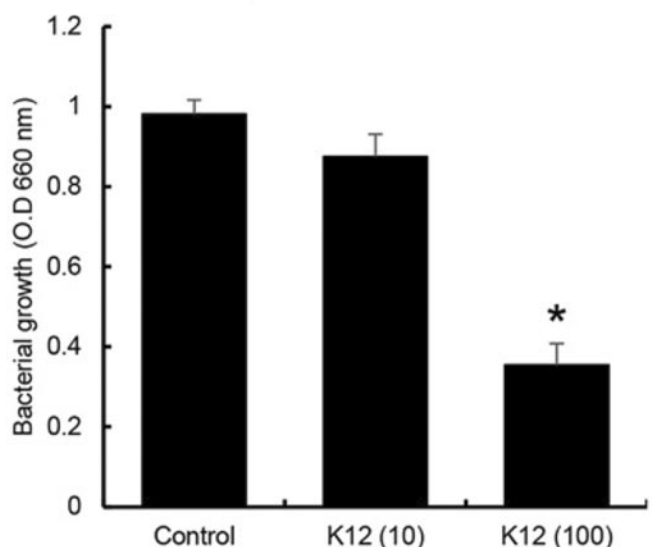
B. *S. mutans*+*S. salivarius* K12(10)



C. *S. mutans*+*S. salivarius* K12(100)



D. *S. mutans* growth



Obr. 2: *S. mutans* při společné kultivaci se *S. salivarius*. *S. mutans* byl inokulován do vnitřní části vložky buněčné kultury (A) a 10násobek nebo 100násobek *S. salivarius* K12 byl inokulován do vnější části vložky buněčné kultury (B a C). Destička byla inkubována 24 hodin a obraz suspenze *S. mutans* byl získán kamerou na mikroskopu (A, B a C). Růst *S. mutans* byl měřen spektrofotometrem (D). Experiment byl proveden třikrát ve dvou opakováních a údaje jsou uvedeny jako průměrná směrodatná odchylka. *(hvězdička) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou.

aktivity při koexistenci v ústní dutině provedena společná kultivace *S. mutans* se *S. salivarius* K12 o 10- a 100násobné koncentraci pomocí Transwellu.

Růst *S. mutans* byl významně inhibován 100násobnou koncentrací *S. salivarius* K12 (obr. 2).

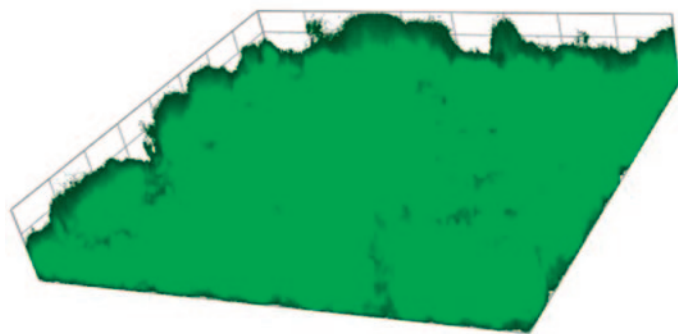
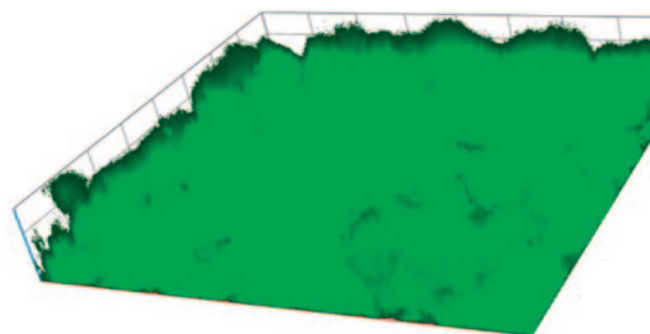
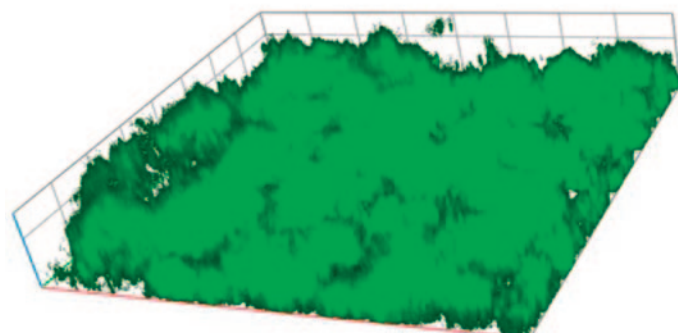
Inhibice tvorby kariogenního biofilmu

Při tvorbě biofilmu pomocí slinných bakterií, ke kterým byl přidáván *S. mutans* po dobu 7 dnů, byl kariogenní biofilm potvrzen měřením pH suspenze biofilmu pomocí destilované vody (údaje nejsou uvedeny). Dále byl při tvorbě kariogenního biofilmu *S. salivarius* K12 ošetřen dvěma koncentracemi. Tvorba biofilmu se snížila, když byl *S. salivarius* K12 ošetřen koncentrací buněk 10^7 (obr. 3). Také při výpočtu biomasy biofilmu pomocí softwaru ImageJ vykazoval kontrolní vzorek biomasy biofilmu $3,25 \times 10^5 \pm 8,86 \times 10^3 \text{ mm}^2$ a vzorky ošetřené *S. salivarius* K12 vykazovaly $3,19 \times 10^5 \pm 1,52 \times 10^3 \text{ mm}^2$ a $2,00 \times 10^5 \pm 1,02 \times 10^3 \text{ mm}^2$ v koncentraci 10^7 , respektive 10^8 buněk (obr. 3D). Ve srovnání s kontrolním vzorkem založeným na 100 % byla úroveň biofilmu ve vzorcích ošetřených *S. salivarius* K12 $98,26 \pm 2,44 \%$ (10^7 buněk) a $63,31 \pm 1,49 \%$ (10^8 buněk).

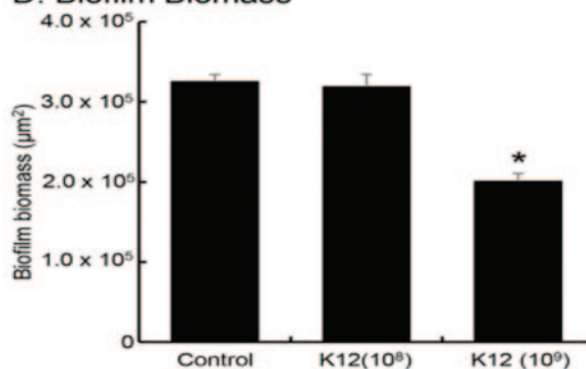
Podíl bakterií v biofilmu

Dále byla za účelem zjištění, zda *S. salivarius* K12 pouze inhibuje tvorbu biofilmu nebo mění podíl bakterií v biofilmu, extrahována genomová DNA z celkového množství bakterií biofilmu a pomocí této DNA byla zpracována kvantitativní PCR. Průměrné množství celkových bakterií v biofilmu vykazovalo $2,05 \times 10^8$ buněk/biofilm a v biofilmu ošetřeném koncentracemi 10^7 a 10^8 *S. salivarius* K12 vykazovalo průměrné množství bakterií $1,90 \times 10^8$ respektive $1,47 \times 10^8$ buněk/biofilm (obr. 4A). Při zkoumání počtu orálních streptokoků v biofilmu vykazoval kontrolní vzorek a vzorek ošetřený *S. salivarius* K12 (10^7) a (10^8) průměrnou hladinu $1,86 \times 10^8$, $1,56 \times 10^8$ a $1,32 \times 10^8$ buněk/biofilm v tomto pořadí (obr. 4B). Celkový počet bakterií a orálních streptokoků v biofilmu významně snížil *S. salivarius* K12 v koncentraci 10^8 buněk ($P < 0,05$). Množství *S. mutans* v biofilmu bylo významně sníženo v obou koncentracích ošetřených *S. salivarius* K12 ve srovnání s kontrolou ($P < 0,05$) (obr. 4C).

A. Control (Saliva bacteria)

B. Adding *S. salivarius* K12 (10^8)C. Adding *S. salivarius* K12 (10^9)

D. Biofilm Biomass



Obr. 3: 3D obraz slinného biofilmu. Při tvorbě biofilmu se slinnými bakteriemi a *S. mutans* byl *S. salivarius* K12 inokulován každý den v koncentraci 10^8 (B) a 10^9 buněk (C). 3D obraz biofilmu byl získán pomocí CLSM. Biomasa biofilmu byla měřena pomocí programu ImageJ (D). Experiment byl proveden třikrát ve dvou opakováních a údaje jsou uvedeny jako průměrná směrodatná odchylka. *(hvězdička) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou.

Na druhou stranu se množství *S. salivarius* v biofilmu významně zvýšilo v obou koncentracích ošetřených *S. salivarius* K12 ($P < 0,05$) (obr. 4D). Tyto výsledky naznačují, že *S. salivarius* K12 kolonizuje v orálním biofilmu, čímž může inhibovat růst *S. mutans*.

Snížení virulentního faktoru *S. mutans* v biofilmu pomocí *S. salivarius* K12

Nakonec bylo zjišťováno, zda je inhibice tvorby biofilmu *S. salivarius* K12 způsobena pouze snížením růstu *S. mutans*, anebo také inhibicí exprese faktorů souvisejících s tvorbou biofilmu *S. mutans*. Proto byla zkoumána exprese gtf *S. mutans* v biofilmu. Expres gtfB, gtfCa gtfD byla významně snížena u *S. mutans* *S. salivarius* K12 ošetřeného biofilmu ($P < 0,05$) (obr. 5).

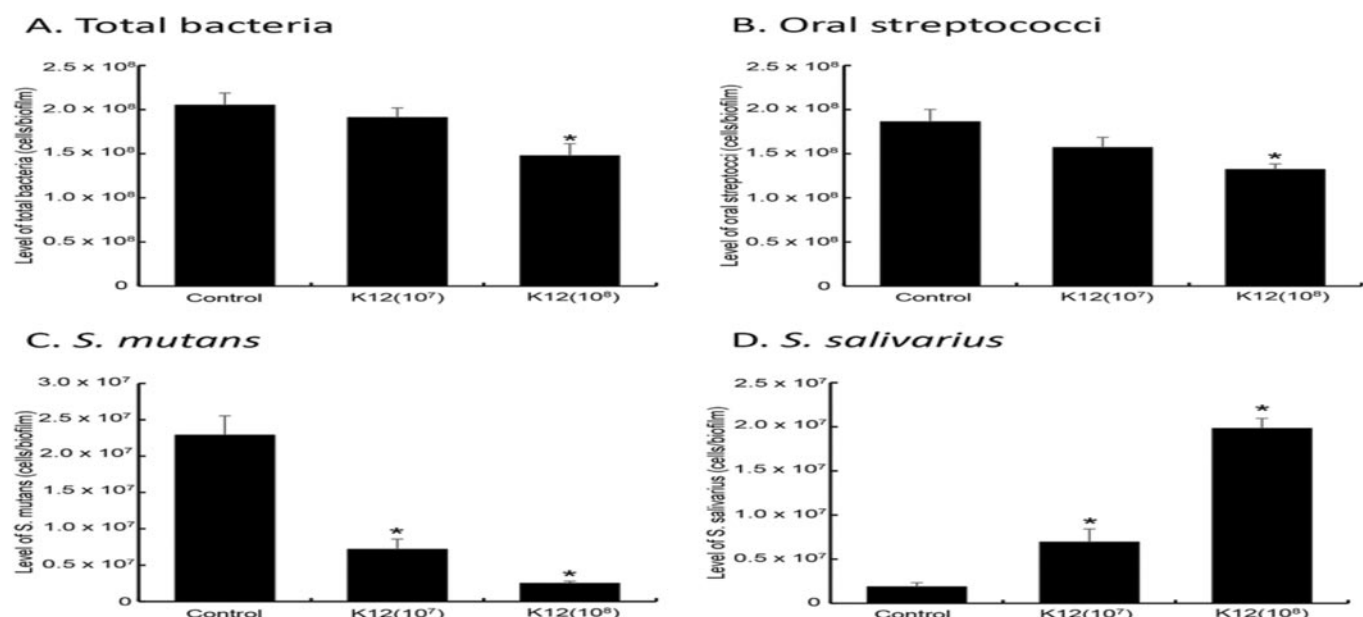
Diskuse

V poslední době je snaha léčit a předcházet nemocem způsobeným patogenními bakteriemi pomocí prospěšných bakterií.^{14,16} Tyto pokusy vedly k dalšímu výzkumu probiotik. Přestože bylo provedeno mnoho studií zaměřených na aplikaci probiotik na onemocnění způsobená bakteriemi v zubním lékařství,⁹ většina probiotik má kyselý charakter a může vyvolávat zubní kaz.^{17,18} *S. salivarius* je časným kolonizátorem epitelového povrchu dutiny ústní u kojenců⁵ a produkuje bakteriocin.¹⁹ Mezi *S. salivarius* patří *S. salivarius* K12 ke známým probiotickým bakteriím a má silnou antimikrobiální aktivitu proti různým bakteriím a plísním.^{20,21} Cílem této studie bylo zjistit vliv *S. salivarius* K12 na kariogenní biofilm a jeho mechanismus inhibice tvorby kariogenního biofilmu.

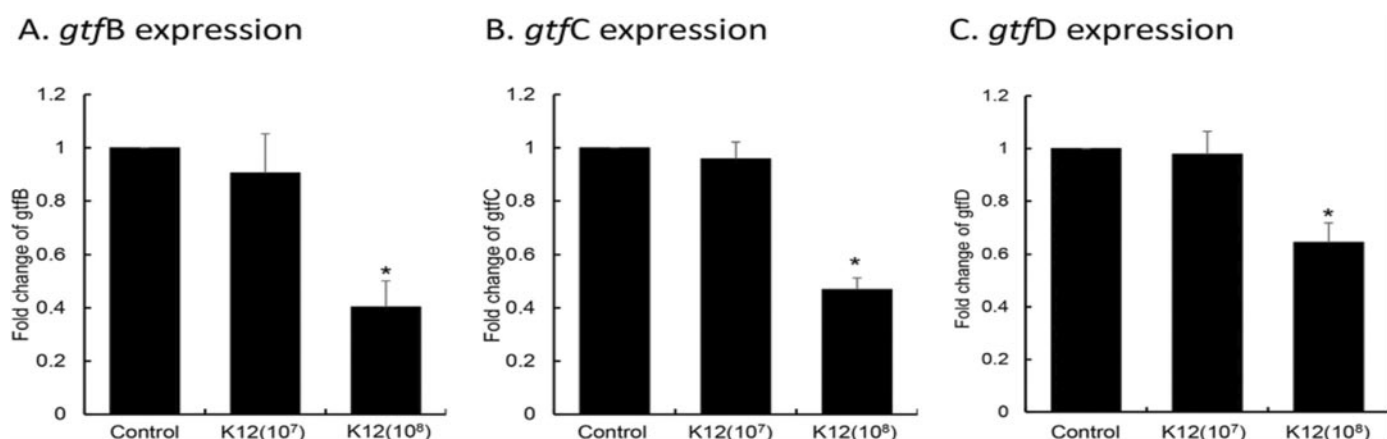
Za prvé *S. mutans* je považována za bakterii úzce spojenou s kariogenním biofilmem, která vytváří lokalizované nízkokyselé prostředí.³ Proto byla zkoumána citlivost *S. mutans* pomocí použitého kultivačního média (SCM) *S. salivarius* K12. SCM *S. salivarius* K12 inhibovalo růst *S. mutans* při 8násobném ředění nebo vyšším. Ve srovnání s SCM jiných probiotik vykazovalo SCM *S. salivarius* K12 slabou antimikrobiální aktivitu.²² Proto bylo pomocí společné kultivace hodnoceno, zda růst *S. mutans* byl inhibován, když byl přítomen *S. salivarius* K12 a v jaké koncentraci. Při společné kul-

tivaci *S. mutans* a *S. salivarius* K12 může *S. mutans* inhibovat růst a metabolismus *S. salivarius* K12 v důsledku produkce velkého množství kyseliny mléčné²³ a *S. salivarius* K12 může inhibovat růst *S. mutans* svým salivarinem jako bakteriocinem.²⁴ *S. salivarius* K12 inhiboval růst *S. mutans* při 100násobku buněk počáteční inokulační koncentrace. Tyto výsledky ukázaly potenciál *S. salivarius* K12 jako kandidáta na probiotikum pro prevenci zubního kazu vyvolaného *S. mutans*. Proto byl zkoumán vliv *S. salivarius* K12 na kariogenní biofilm s využitím slinných bakterií a *S. mutans*. Když se ze slinných bakterií odebraných zdravému dárci a *S. mutans* vytvořil biofilm na 7 dní, byl biofilm považován za kariogenní biofilm, protože vykazoval nízké pH (pod pH 5,5) dostatečné pro vyvolání zubního kazu,²⁵ a byl testován účinek *S. salivarius* K12 na kariogenní biofilm. Pro hodnocení účinnosti aplikace *S. salivarius* K12 na kariogenní biofilm bylo každý den ošetřeno 10^7 a 10^8 buněk *S. salivarius* K12 při tvorbě biofilmu (koncentrace vykazovaly antimikrobiální účinek v kokultivaci). Tvorba biofilmu byla snížena u bakterií ošetřených *S. salivarius* K12. Při tvorbě biofilmu *S. salivarius* K12 inhiboval tvorbu biofilmu navzdory prostředí bohatému na sacharózu. Tyto výsledky naznačují možnost, že trvalým užíváním produktů *S. salivarius* K12 lze předcházet zubnímu kazu. Zda se jedná o zdravý biofilm nebo kariogenní biofilm podle mikrobiálního ekosystému, naznačil Marsh, P.D.²⁶ Když se zkoumala distribuce *S. mutans* v biofilmu na základě orálních streptokoků, vykazovaly hladiny *S. mutans* v kontrolní skupině průměrně 12,3 % a poměr *S. mutans* byl 4,5 % a 1,9 % ve skupině léčené *S. salivarius* K12 v závislosti na dávce. Kromě toho byla hladina *S. salivarius* v biofilmu u skupiny léčené *S. salivarius* K12 zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou. A konečně údaje, které ukazují, že *S. salivarius* K12 může přeměnit kariogenní biofilm na zdravý biofilm.

Glukosyltransferázy *S. mutans* hrají důležitou roli při tvorbě biofilmu.²⁷ Proto byla exprese gtf genu *S. mutans* v biofilmu zkoumána pomocí RT-PCR v reálném čase. Při každodenním ošetření 10^7 a 10^8 buněk *S. salivarius* K12 při tvorbě biofilmu byla exprese gtfB, C a D *S. mutans* v biofilmu významně snížena. Nakonec může *S. salivarius* K12 inhibovat expresi gtf genů i růst *S. mutans*.



Obr. 4: podíl bakterií v biofilu. Při tvorbě biofilu se slinnými bakteriemi a *S. mutans* byl *S. salivarius* K12 každý den inokulován v koncentraci 10⁸ a 10⁹ buněk. Po extrakci celkové DNA byly pomocí qPCR analyzovány celkové bakterie (A), orální streptokoky (B), *S. mutans* (C) a *S. salivarius* (C) v biofilu s použitím specifických primerů. Experiment byl proveden třikrát ve třech opakováních a údaje jsou uvedeny jako průměrná směrodatná odchylka. *(hvězdička) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou.



Obr. 5: vliv *S. salivarius* K12 na expresi gtf genů *S. mutans* v biofilu. Při tvorbě biofilu se slinnými bakteriemi a *S. mutans* byl *S. salivarius* K12 každý den inokulován v koncentraci 10⁸ a 10⁹ buněk. Po extrakci celkové RNA byla pomocí RT-PCR analyzována exprese gtfB (A), gtfC (B) a gtf D (C). Experiment byl proveden třikrát ve třech opakováních a údaje jsou uvedeny jako průměrná směrodatná odchylka. *(hvězdička) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolou.

Závěrem lze říci, že *S. salivarius* K12 inhiboval tvorbu kariogenního biofilu a rovněž růst *S. mutans* v biofilu. Tyto účinky se mohou projevit inhibicí růstu a produkce glukosyltransferáz *S. mutans* antimikrobiální aktivitou *S. salivarius* K12. *S. salivarius* K12 může navíc kolonizovat orální biofilm. Proto lze *S. salivarius* K12 mezi probiotiky považovat za účinného kandidáta na prevenci zubního kazu.

Prohlášení o střetu zájmů: Autoři prohlašují, že v souvislosti s tímto článkem nejsou ve střetu zájmů.

Konkurenční zájmy: Autoři nemají žádné konkurenční zájmy. **Přijato:** 7. července 2022; konečná revize přijata 14. července 2022

Literatura

- Lemme A, Sztajer H, Wagner-Dobler L. Characterization of mler, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol* 2010;10:58.
- Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23:213e9.
- Lee SH, Choi BK, Kim YJ. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. *Arch Oral Biol* 2012;57: 697e703.
- Wennerholm K, Birkhed D, Emilson CG. Effects of sugar restriction on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. *Caries Res* 1995;29:54e61.
- Marsh PD, Head DA, Devine DA. Dental plaque as a biofilm and a microbial community—Implications for treatment. *J Oral Biosci* 2015;57:185e91.
- Tagg JR. Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian J Med Res* 2004;119:13e6.
- Burton JP, Wescombe PA, Moore CJ, Chilcott CN, Tagg JR. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:3050e3.
- Burton JP, Cowley S, Simon RR, McKinney J, Wescombe PA, Tagg JR. Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Food Chem Toxicol* 2011;49: 2356e64.
- Meurman JH, Stamova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis* 2007;13:443e51.
- Barbour A, Wescombe P, Smith L. Evolution of lantibiotic salivarians: new weapons to fight infectious diseases. *Trends Microbiol* 2020;28:578e93.
- Hecht DW, Citron DM, Cox M, et al. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard—Seventh edition (M11-A7). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.

- Fujiwara T, Hoshino T, Oshima T, Hamada S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyl-transferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *J Dent Res* 2002;81:109e13.
- Takle GW, Toth IK, Brurberg MB. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atropsectum*. *BMC Plant Biol* 2007;7:50.
- Kovachev SM, Vatcheva-Dobrevska RS. Local probiotic therapy for vaginal *Candida albicans* infections. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2015;7:38e44.
- Scalaferrini F, Gerardi V, Lopetuso LR, et al. Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *BioMed Res Int* 2013;2013:435268.
- Guarino A, Guandalini S, Lo Vecchio A. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2015;49: 537e45.
- Corcoran BM, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:3060e7.
- Collado MC, Sanz Y. Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *J Appl Microbiol* 2007;103: 1147e57.
- Hyun K, Wescombe PA, Upton M, Ragland N, Burton JP, Tagg JR. Salivarin A2 and the novel lantibiotic salivarin B are encoded at adjacent loci on a 190-kilobase transmissible megaplasmid in the oral probiotic strain *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1107e13.
- Zupancic K, Krkic V, Kovacevic J, Kovacevic D. Influence of oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on ear and oral cavity health in humans: systematic review. *Probiotics Anti-microb Proteins* 2017;9:102e10.
- Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Appl Environ Microbiol* 2012;78:2190e9.
- Kim YJ, Lee SH. Inhibitory effect of lactococcus lactis HY 449 on cariogenic biofilm. *J Microbiol Biotechnol* 2016;26: 1829e35.
- Castillo A, Rubiano S, Gutierrez J, Hermoso A, Liebana J. Post-pH effect in oral streptococci. *Clin Microbiol Infect* 2000;6: 142e6.
- Wescombe PA, Dyet KH, Dierksen KP, et al. Salivarin G32, a homolog of the prototype *Streptococcus pyogenes* nisin-like lantibiotic SA-F22, produced by the commensal species *Streptococcus salivarius*. *Internet J Microbiol* 2012;2012: 738503.
- Daves C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003;69:722e4.
- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263e71.
- Ren Z, Cui T, Zeng J, et al. Molecule targeting glucosyl-transferase inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:126e35.

Vyzkoušejte další produkty řady

BACTO

favea Bactoblis®
BEST PRODUCT OF THE YEAR
Mikrobiota pro dutinu ústní

Bactoral

Streptococcus salivarius K12

doplnek stravy
výživový doplnok

VYROBENO PODLE
ŠVÝCARSKÉHO PATENTU

**ORÁLNÍ PROBIOTIKUM
ORÁLNA MIKROBIOTA**

16 tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

Bactoral **AKUT** **IMUNO**

Streptococcus salivarius K12
Lactobacillus paracasei (L. CASEI 431®)

První kombinace probiotických kmenů kolonizujících
a chránících jak střevo, tak sliznice úst a hltanu.

doplnek stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplnok pre dospelých a deti od 3 rokov

10 tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

**PREMIUM
PROBIOTIC
PROTECTION**

Yuzu-
mátová
příchuť

favea

Bactoral **Baby**

Streptococcus salivarius K12

pro doplnění přátelské mikrobioty
krku, dutiny ústní a středouší

s vitamínem D na podporu imunity

Pro děti od 1 roku
Pre deti od 1 roka

30 sáčků
vrecúšok

Obsahuje patentované probiotikum a prebiotikum

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

Bactoral **NEO**

Streptococcus salivarius K12

+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY
+ PRO ZDRAVÉ ZUBY

doplnek stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplnok pre dospelých a deti od 3 rokov

30 tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

Bactodermal **Baby**

Streptococcus salivarius K12

doplnek stravy se sladidlem | výživový doplnok so sladidlom

OPTIMALIZOVANÁ KOMBINACE PATENTOVANÉHO
PROBIOTIKA S BIOTINEM A VITAMÍNEM D
PRO UDRŽENÍ ZDRAVÉHO STAVU POKOŽKY

Obsahuje probiotika
Obsahuje prebiotiká

Pro děti od 1 roku
Pre deti od 1 roka

30 sáčků
vrecúšok

DERMALAC ZYN

favea

detail zdravé kůže

Bactoral

Streptococcus salivarius K12

+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY

doplnek stravy pro dospělé a děti od 3 let
výživový doplnok pre dospelých a deti od 3 rokov

30 tablet rozpustných v ústech
tablet rozpustných v ústech

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNA MIKROBIOTA

Bactodermal

Streptococcus salivarius K12

doplnek stravy se sladidlem | výživový doplnok so sladidlom

OPTIMALIZOVANÁ KOMBINACE PATENTOVANÉHO PROBIOTIKA S BIOTINEM
A VITAMÍNEM D PRO UDRŽENÍ ZDRAVÉHO STAVU POKOŽKY

Obsahuje probiotika | Obsahuje prebiotiká
Pro dospělé a děti od 3 let | Pre dospelé a deti od 3 rokov

30 pastilek
pastilek

DERMALAC ZYN

favea

detail zdravé kůže

Bactorhino +VITAMÍN D

doplnek stravy | výživový doplnok

**PATENTOVANÉ PROBIOTIKUM
SLIZNICE NOSU
PYLOVÁ SEZÓNA**

Obsahuje probiotika | prebiotiká

RHINO ZYN

VYROBENO PODLE
ŠVÝCARSKÉHO PATENTU

30 tobolek
tobolek

VYROBENO PODLE
ŠVÝCARSKÉHO PATENTU



favea **+**
pro vaše zdraví

Doplňky stravy z naší nabídky dostanete v lékárnách nebo na eshop.faveaplus.cz

NAŠI OBCHODNÍ ZÁSTUPCI

Praha, Praha východ a západ
Tel.: 771 227 095

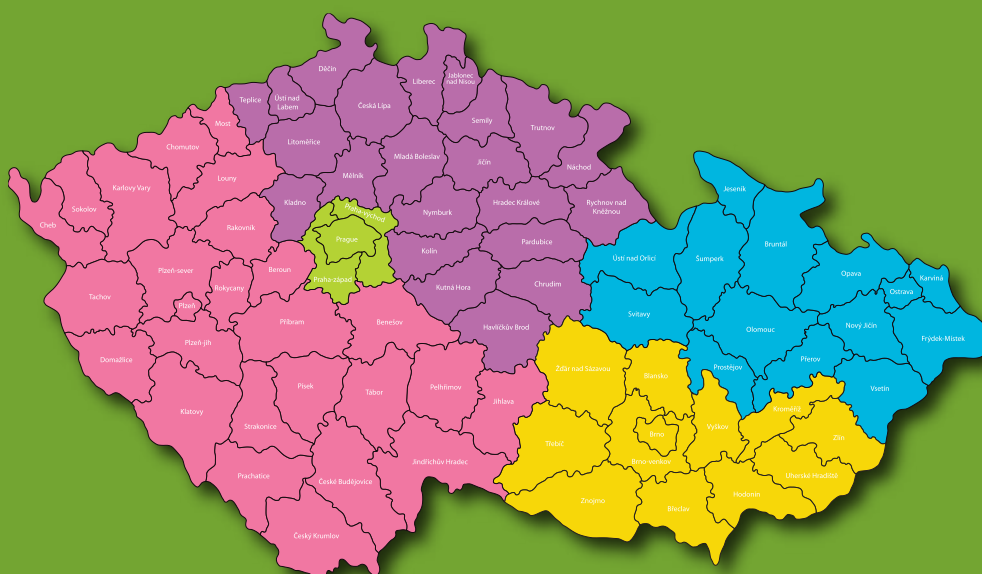
Jižní Morava
Tel.: 775 870 028

Severní Morava
Tel.: 778 464 095

Jihozápadní Čechy
Tel.: 702 134 766

Severovýchodní Čechy
Tel.: 725 887 084

Kancelář:
info@faveaplus.cz,
Tel.: 778 733 358
www.faveaplus.cz
www.facebook.cz/faveaplus.cz
IG: favea_plus



favea 
pro vaše zdraví