

Bactoral

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM



***Streptococcus salivarius* K12** **ochrana před infekcemi**

**horních cest dýchacích,
středouší
a dutiny ústní**

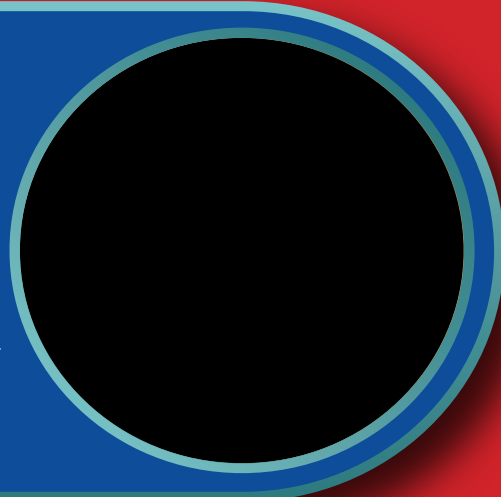
favea 
pro vaše zdraví

Publikace je určena
pro odbornou veřejnost



Bactoral

Streptococcus salivarius K12
pro doplnění přátelské mikrobioty
krku, dutiny ústní a středouší



Bactorhino +VITAMIN D

*Účinné probiotické řešení
pylové sezóny*



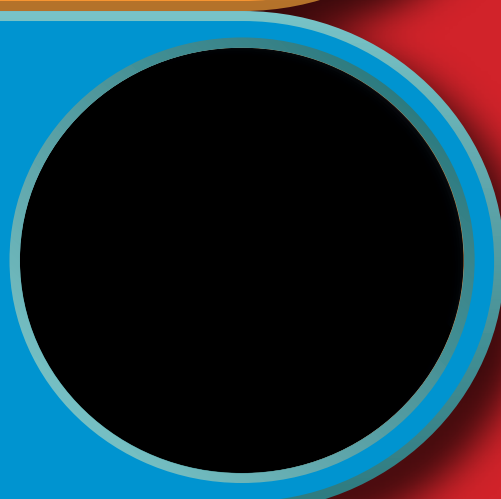
Bactodermal

*Péče o atopickou pokožku
začíná ve střevě*



ProbioLact

*Biofilmová probiotika 4. generace
- základem imunitního systému
jsou dobře fungující střeva*



Obsah:

Probiotika	2
Ústní mikrobiom a implikace pro zdraví	3
Charakteristiky ideálních ústních probiotik	3
<i>Streptococcus salivarius</i> K12, model probiotik pro infekce uší, nosu a krku	4
Jak přípravek Bactoblis® s obsahem <i>Streptococcus salivarius</i> K12 léčí infekce uší, nosu a hrdla	5
Kolonizace <i>Streptococcus salivarius</i> K12 v dutině ústní	6
Hodnocení bezpečnosti <i>Streptococcus salivarius</i> K12	6
Klíčové klinické výhody přípravku Bactoblis®	7
 SOUHRN KLINICKÝCH STUDIÍ	
Profylaktické podávání přípravku Bactoblis® u dětí je účinně schopno snížit incidenci faryngo-tonzilitidy a akutní otitis media	8
Bactoblis® zkracuje délku antibiotické a antipyretické léčby	9
Bactoblis® efektivně snížil počet epizod rekurentní streptokokové faryngotonsilitidy a akutní otitis media u dětí a dospělých a účinky přetrvávaly po dobu 6 až 12měsíčního následného sledování.	10
Léčba přípravkem Bactoblis® jako doplňková terapie ke konvenční terapii antibiotiky a protizánětlivými léky je efektivnější než samostatná konvenční terapie u dětí s rekurentní tonsilitidou	11
Bactoblis® zkracuje dobu absence z práce a ze školy	12
Bactoblis® také snížil počet plánovaných adenotonsilektomií	13
Bactoblis® efektivně snižuje výskyt virových faryngitid a faryngotonsilitid u dětí indukcí interferonu gama (IFN-γ) a snížením virového titru během virových infekcí	14
Bactoblis® snižuje přítomnost klíčových patogenů u dětí a kojenců s dysbiotickými poruchami v dutině ústní a horních cestách dýchacích	15
 Bactoblis® má odlišná složení pro všechny věkové skupiny	16
Souhrn	17
Literatura	18
 Nová klinická studie dokládá, že <i>Streptococcus salivarius</i> K12 snižuje výskyt infekcí SARS-CoV-2	19
 Zůstat zdraví během chřipkové sezony - Bactoral Imuno	20
 Bactoral Imuno - prezentace	22
 Bactoral – <i>Streptococcus salivarius</i> K12 enumerace a inhibiční aktivita podobných kmenů z komerčních produktů	28
 <i>Streptococcus salivarius</i> K12 a stomatologická praxe	30
 <i>Streptococcus salivarius</i> K12 inhibuje aktivaci imunitního systému patogeny parodontálního onemocnění	31
 Inhibiční účinky <i>Streptococcus salivarius</i> K12 na tvorbu kariogenního biofilmu	41
 Protizánětlivá účinnost <i>Streptococcus salivarius</i> lidského původu na zánět vyvolaný parodontopatogeny	47

Probiotika

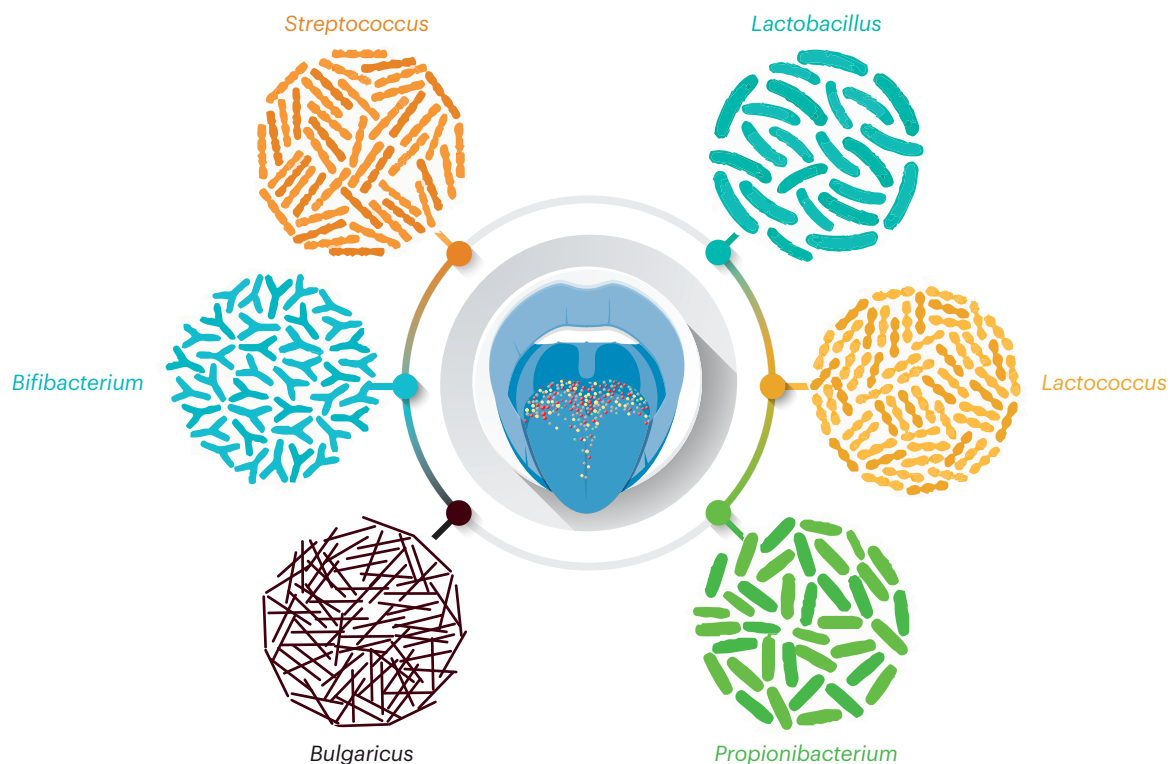
Pojem probiotika je odvozen od latinského (pro) a řeckého (bios) a znamená „pro život“. Je dlouhodobě spájen s celkovým zdravím. Světová zdravotnická organizace popisuje probiotika jako „živé mikroorganismy, které při podávání v adekvátních množstvích poskytují hostiteli zdravotní výhody.“¹

Tuto definici lze upravit pro probiotické potraviny / doplňky zvýrazněním příznivého účinku mikroorganismů „při konzumaci v adekvátních množstvích jako součást stravy“.

Probiotické mikroorganismy jsou typicky konzumované ve fermentovaných potravinách (tzn. sýry, jogurty).^{1,2} Nejčastěji používané probiotické kmeny jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, následované rody: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* a *Escherichia coli*.¹

I když se probiotika u lidí používají dlouho, došlo k rozsáhlé a významné obnově zájmu o koncept lidského mikrobiomu a probiotik.

To lze přisuzovat výzkumu v posledních letech, který prokázal, že probiotika se zdají zkracovat délku nebo bránit rozvoji infekcí.



Ústní mikrobiom a implikace pro zdraví

V lidských ústech se vyskytuje kolem 700 různých druhů mikroorganismů (včetně bakterií, hub, virů a protozoa) představujících ústní mikrobiom. Je to druhý největší mikrobiom ve střevech.³ Ústní mikrobiom je zásadní pro udržování ústního a systémového zdraví. Za normálních podmínek udržuje ústní mikrobiom zdraví a rovnováhu. Určité nerovnováhy tohoto stavu umožňují manifestaci patogenů a rozvoj onemocnění.

Hlavními zástupci v ústech jsou bakterie jako Firmicutes, *Bacillus*, *Proteobacteria* a aktinomycety.³ Rudimentární ústní mikrobiom vzniká během hodin od narození, dominují v něm streptokoky. Počet a typy bakterií tvořících ústní mikrobiom s věkem roste. Kultivační analýzy prokázaly dominanci streptokoků, hlavně členů skupin *Mitis* a *Salivarius*, od období časně po narození až do dospělosti.⁴

Dutina ústní obsahuje několik bakterií s příznivými účinky schopnými produkovat široké spektrum antikompetičních, antibakteriálních peptidů jako např. bakteriociny.⁴ Bakteriociny jsou genově kódované, díky čemuž jsou přístupné vůči genetickým alteracím s cílem zlepšit funkční charakteristiky. Také vykazují nízkou toxicitu. Interagují se širokým spektrem receptorů, které se liší od cílů antibiotik. Díky tomu jsou křížové rezistence méně pravděpodobné.

Probiotika jsou živé organismy, které po požití příznivě působí na zdraví. Tato „přírodní antibiotika“ produkující bakteriocin jsou schopné pokrýt potřeby vznikající ve spojitosti s novými rezistencemi bakterií vůči konvenčním antibiotikům. Probiotika zaměřená na dutinu ústní fungují jiným způsobem než probiotika přítomná ve střevě. Probiotické organismy dutiny ústní mají vyšší pravděpodobnost, že (a) budou přirozeně schopny produkovat antikompetiční molekuly proti virulentním bakteriím běžně přítomným v dutině ústní, které se mohou nekontrolovaně množit a způsobit infekci, a/nebo (b) že budou modulovat funkčnost lidských hostitelských buněk v dutině ústní a aktivně chránit hostitele před zánětem a apoptózou způsobenými patogeny.⁵

Charakteristiky ideálních ústních probiotik⁴⁻⁷



Nízký patogenní potenciál

Vysoké přirozeně se vyskytující hladiny probiotik korelují se zvýšenou tvorbou bakteriocinů, které jsou zaměřeny proti patogenním bakteriím. Tímto systémem je zajištěna ochrana proti zánětu nebo apoptóze.

Zaměření na specifické patogeny

Bakteriociny tvořené probiotickými bakteriemi pomáhají působit mezi druhy i v rámci druhů obývajících dutinu ústní. Vyšší počty probiotických druhů mohou vést k efektivnímu zaměřování na patogeny.

Propagace, integrace a eliminace v lidském hostiteli

Jednoduchá propagace in vitro a viabilní aplikace u lidského hostitele pomáhají aktivně chránit hostitele před zánětem a apoptózou indukovanými patogeny. Toto působení je dále podporováno, pokud probiotika přetrvávají na účinných hladinách v hostiteli po delší dobu. Podobně jako u integrace by měla být eliminace jednoduchá (např. podáním antibiotik).

Genetická stabilita

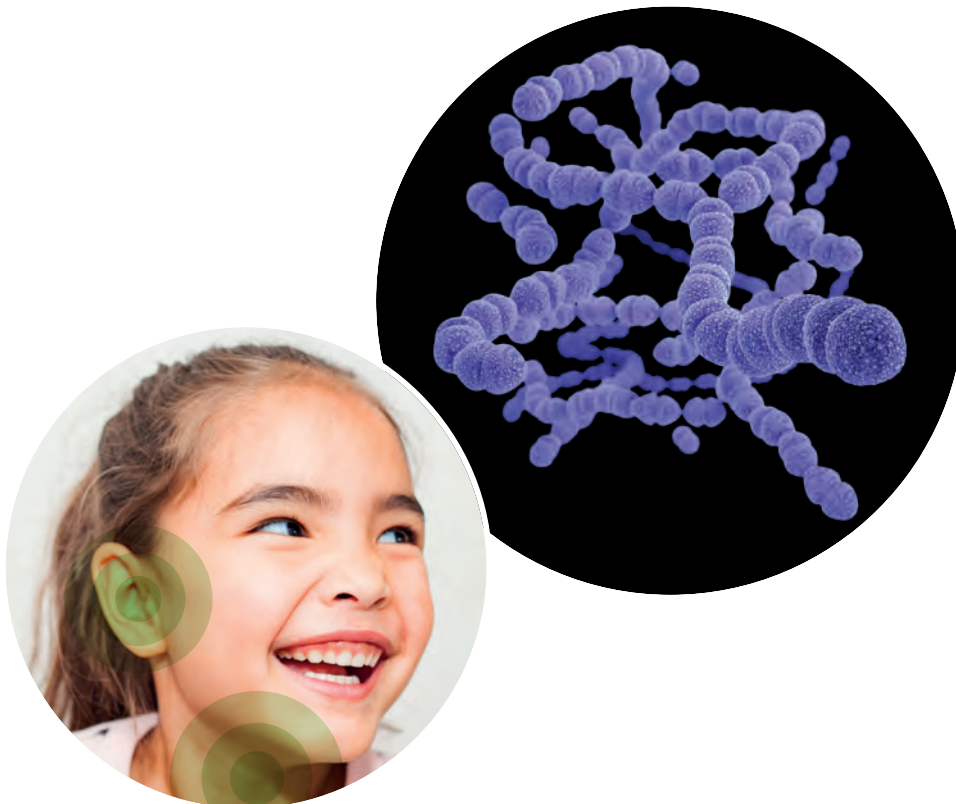
Genetickou stabilitu lze určit během bezpečné a dlouhodobé přítomnosti v lidském hostiteli. Stimulovaná exprese určitých genů se může podílet na homeostáze a opravě buněk

Streptococcus salivarius K12, Model probiotik pro infekce uší, nosu a krku

Mezi streptokoky patří několik patogenních a nepatogenních druhů.⁵ Z nepatogenních druhů přítomných jako běžní komenzáli dutiny ústní tvoří *Streptococcus salivarius* největší množství bakteriocinů. Několik z nich je detekováno v lidských slinách.^{5,8} Bakteriociny jsou malé antibakteriální peptidy široce používané u kompetice v rámci druhu a mezi druhy. Aktivita inhibičních látek podobných bakteriocinům (BLIS) je kódována velkými (až 240 kb) megaplasmidy (přenosné DNA prvky). Přibližně 30 % kmenů *Streptococcus salivarius* obsahuje megaplasmidovou DNA.⁹

V roce 1989 byl izolován kmen K12 *Streptococcus salivarius* ze slin zdravého dítěte. Byl to kolonizátor ústní sliznice dětí a dospělých. Byl efektivní vůči ORL infekcím a pomáhal snižovat vrozenou imunitní odpověď lidských epiteliálních buněk.^{4,10} Ve studii u školních dětí mělo 40 % dětí *Streptococcus salivarius* K12 tvořící BLIS. Tyto děti vykazovaly určitou tvorbu BLIS (P)-typů a korelovaly s nižším výskytem infekcí *Streptococcus pyogenes* během 10 měsíců.⁴

Streptococcus salivarius K12 je ideálním kandidátem pro vývoj jako modelové probiotikum z dutiny ústní.⁵ *Streptococcus salivarius* tvoří nejenom širokospektré bakteriociny, ale obsahuje také megaplasmidy kódující bakteriociny (a indukující bakteriociny), které pomáhají proti různým patogenním mikrobům.⁵ Jako modelové orální probiotikum je *Streptococcus salivarius* K12 komerčně dostupný jako přípravek pro bakteriální suplementaci.



Jak přípravek Bactoblis® s obsahem *Streptococcus salivarius* K12 léčí infekce uší, nosu a hrdla^{5,11,12}

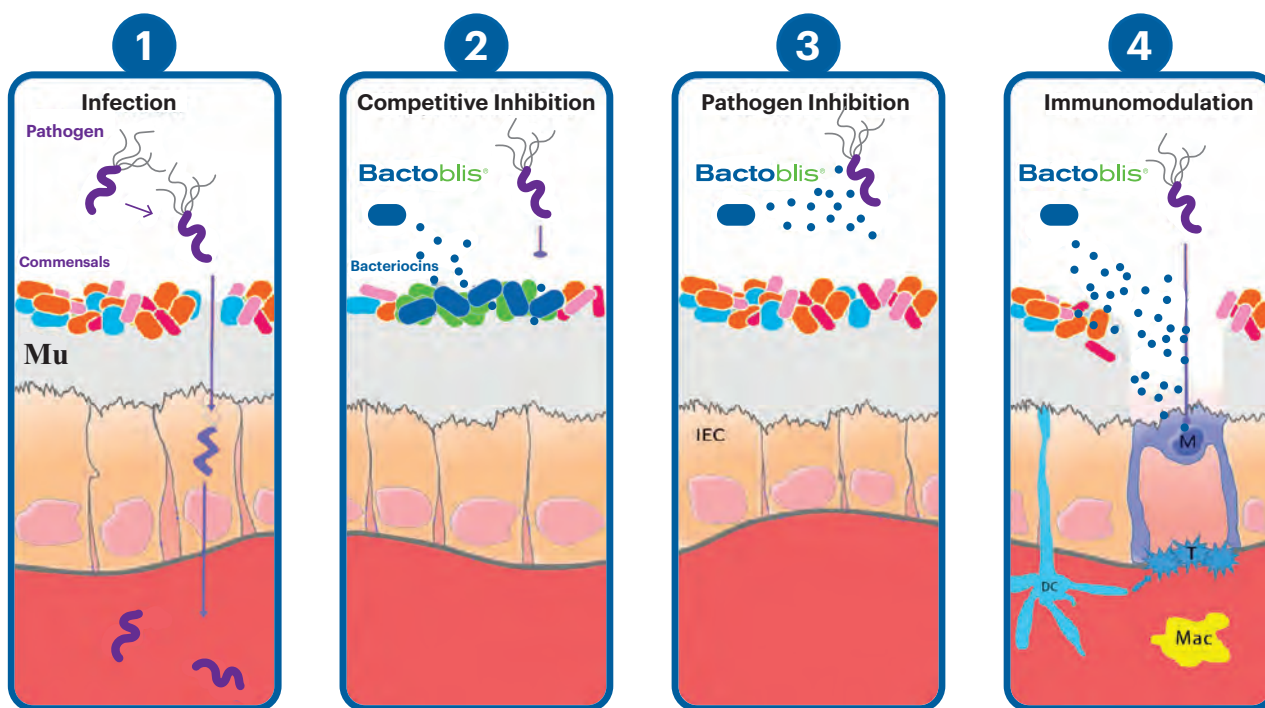
Streptococcus salivarius K12 je účinnou složkou přípravku Bactoblis® tvořící BLIS. *Streptococcus salivarius* K12 tvoří velké množství BLIS. Nejběžnější je salivarin A (SalA1-A5) a salivarin B.⁵ Tyto dva salivarciny působí jako antagonisté pro určité patogenní kmeny.⁵

Aktivita BLIS kódovaná 190kb megaplasmidy je efektivně schopna působit proti růstu β -hemolytického *Streptococcus pyogenes*, původce faryngitidy, tonsilitidy a akutní otitis media. BLIS K12 také inhibuje růst *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus anginosus*, *Eubacterium saburreum* a *Micromonas micros*, mnoho z nich jsou potenciální patogeny v dutině ušní a ústní a způsobují akutní otitis media a halitózu.⁵ Tento inhibiční efekt je silně spojen s antibiotickým uvolňováním, jelikož BLIS K12 P (-), stejný kmen bez 190kb megaplasmidu nevykazuje antagonistické chování.

Studie také ukazují, že perorální podávání *Streptococcus salivarius* K12 může kolonizovat orofarynx, snižuje plasmatické koncentrace IL-8 a zvyšuje obsah interferonu- γ v slinách.^{13,14} Tyto účinky mohou být základem protizánětlivé a antivirové aktivity spolu s antibakteriálním působením.

Čtyřkrokový mechanismus, kterým bakteriociny zprostředkovávají vlastnosti bakterií, jež je tvoří, zahrnují^{11,12}:

- 1) Patogen napadne sliznici a vede k aktivní infekci.
- 2) Poté podporuje kolonizaci hostitele kompetitivní inhibicí patogenních mikrobů.
- 3) Může přímo interagovat s patogenním cílem a inhibovat jej.
- 4) Dále napomáhá imunomodulaci náborem imunitních buněk v daném místě jako pomůcku při eliminaci patogenů



MU: sliznice; IEC: střevní epitelální buňka; DC: dendritická buňka; MAC: makrofág; T: T buňka; M: M buňka

Kolonizace *Streptococcus salivarius* K12 v dutině ústní

Studie distribuce a perzistence probiotického *Streptococcus salivarius* K12 v lidské dutině ústní na základě kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase¹⁵

Pastilky se *Streptococcus salivarius* K12 obsahující po 10¹⁰ buněk byly podávány jednotlivci bez anamnézy terapie K12 každý den po dobu 3 dní. Hladiny genu *salA* byly měřeny na 16 různých místech v ústech v 6 různých intervalech během 35 dní. Výsledky ukázaly nárůst hladin na 32 900 CFU v den 8 s následným postupným poklesem. Přetrvávaly však asi 3 týdny.¹⁵

Hladina probiotického kmene (jako ekvivalenty CFU pro počet kopií genu *salA* (*salA*-CFU) za čas po podávání čtyř pastilek *Streptococcus salivarius* K12 každý den po dobu 3 dní

Den 4	Den 8	Den 14	Den 21	Den 28	Den 35
1600	32,900	300	500	100	100

Hodnocení bezpečnosti *Streptococcus salivarius* K12^{6,7}

Preklinické studie bezpečnosti u krys nezjistily žádnou genotoxicitu ani akutní či subakutní toxicity spojené s *Streptococcus salivarius* K12.⁷

Když se *Streptococcus salivarius* K12 podává u lidí v denních dávkách 1x10⁹ CFU, nepřetrvává v hladinách vyšších než hladiny podobné populacím *Streptococcus salivarius*, které se přirozeně vyskytují u lidského hostitele.⁷

Hodnocení bezpečnosti v klinické studii také prokázalo absenci nežádoucích reakcí u subjektů aktivně požívajících *Streptococcus salivarius* K12, co podporuje výsledky analýzy biochemického profilu, antibiogramu a virulenčního genového profilu této bakterie. Bylo prokázáno, že *Streptococcus salivarius* K12 má velice nízký patogenní potenciál a není pravděpodobné, že by způsoboval onemocnění u zdravých lidí.⁶



Klíčové klinické výhody přípravku Bactoblis®

Bactoblis®, celosvětově první patentované orální probiotikum obsahující *Streptococcus salivarius* K12, disponuje rozsáhlými důkazy in vitro a in vivo dokládajícími účinnosti proti infekcím streptokoků, což dále objasňuje 19 klinických hodnocení:

Snižuje incidenci infekcí ucha a hrdla

Randomizované hodnocení a retrospektivní observační studie o podávání přípravku Bactoblis® s významným poklesem epizod streptokokové faryngitidy, akutní otitis media a faryngotonsilitidy.

> Strana č. 8

Zkracuje antibiotickou terapii a používání antipyretik

Nerandomizované kontrolované hodnocení a retrospektivní observační studie uvádí, že léčba přípravkem Bactoblis® vedla ke sníženému počtu dní s aktivní léčbou antibiotiky a antipyretiky.

> Strana č. 9

Způsobuje méně rekurentních infekcí

Výsledky z randomizovaného a nerandomizovaného klinického hodnocení ukázaly, že Bactoblis® efektivně snížil výskyt epizod rekurentní streptokokové faryngotonsilitidy. Další retrospektivní observační studie také prokázala významný pokles rekurentních streptokokových faryngotonsilitid u dětí užívajících přípravek Bactoblis®.

> Strana č. 10

Efektivní jako doplňková terapie k antibiotikům a protizánětlivým lékům

Nerandomizované kontrolované klinické hodnocení dokázalo, že léčba přípravkem Bactoblis® jako doplňková terapie ke konvenční terapii antibiotiky a protizánětlivými léky je efektivnější než samostatná konvenční terapie u dětí s rekurentní tonsilitidou.

> Strana č. 11

Vede k nižšímu počtu vynechaných dní ze školy a práce

Multicentrické hodnocení u dětí a retrospektivní analýza u dospělých ukázaly, že profylaktické podávání přípravku Bactoblis® vedlo ke snížení počtu dní vynechaných ze školy nebo práce.

> Strana č. 12

Snižuje výskyt adenotonsilektomií

Prospektivní multicentrická studie ukázala, že 90 dní podávání přípravku Bactoblis® u dětí s rekurentní streptokokovou faryngotonsilitidou vedlo ke zrušení plánovaných adenotonsilektomií.

> Strana č. 13

Snižuje incidenci virových infekcí horních cest dýchacích

Zprávy z nerandomizovaných kontrolovaných hodnocení prokázaly, že léčba přípravkem Bactoblis® efektivně snížila výskyt virové faryngitidy a virové faryngotonsilitidy u dětí, což lze připsat ke snížení virového titru v důsledku interferonu gama (IFN-γ) indukovaného přípravkem Bactoblis®.

> Strana č. 14

Snižuje přítomnost klíčových patogenů v dutině ústní

Randomizované a nerandomizované observační studie prokázaly, že léčba přípravkem Bactoblis® významně snížila kolonizaci dutiny ústní podmíněně patogenní mikroflórou u kojenců a dětí. Z toho důvodu by Bactoblis® mohl pomoci korigovat dysbiotická onemocnění sliznic horních cest dýchacích a/nebo dutiny ústní u dětí a kojenců.

> Strana č. 15

SOUHRN KLINICKÝCH STUDIÍ

Profylaktické podávání přípravku Bactoblis® u dětí je účinně schopno snížit incidenci faryngo-tonsilitidy a akutní otitis media

Účinky podávání přípravku Bactoblis® na výskyt streptokokové faryngotonsilitidy, šarlachu a akutní otitis media u 3letých dětí

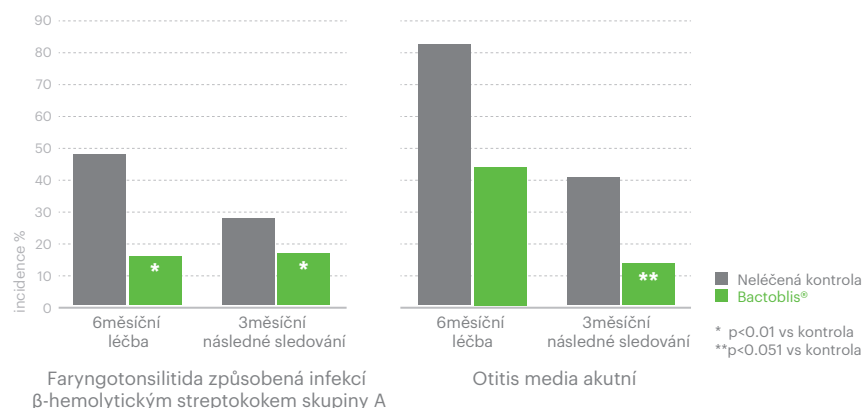
European Review for Medical and Pharmacological Sciences¹⁰

Cíl: Předkládaná studie hodnotila roli přípravku Bactoblis® při kontrole streptokokové infekce a akutní otitis media u dětí navštěvujících školku první rok.

Metody: Děti ve věku 3 let bez anamnézy faryngotonsilitidy v důsledku infekce -hemolytickým streptokokem skupiny A a akutní otitis media byly randomizovány do skupiny dostávající Bactoblis® (n=111) a kontrolní skupiny bez léčby (n=111). Léčba přetrvávala 6 měsíců a následovalo 3měsíční sledování. Hodnocena byla tolerance léčby a epizody streptokokové faryngotonsilitidy a akutní otitis media.

Výsledky: Během 6měsíční léčby byly incidence streptokokové faryngotonsilitidy a akutní otitis media přibližně 16 %, resp. 44 % v léčené skupině a 49 %, resp. 80 % v kontrolní skupině. Během 3měsíčního sledování byl výskyt infekcí 17 %, resp. 14 % v léčené skupině a 28 %, resp. 41 % v kontrolní skupině. Během studie nebyly zjištěny žádné zjevné vedlejší účinky přípravku Bactoblis®.

Závěr: Denní podávání přípravku Bactoblis® u dětí v prvním roku školky významně snížilo výskyt epizod streptokokové faryngitidy a akutní otitis media.



Použití přípravku Bactoblis® za účelem snížení incidence faryngo-tonsilitidy a akutní otitis media u dětí: retrospektivní analýza u nerekurentních pediatrických pacientů

Minerva Pediatrica¹⁶

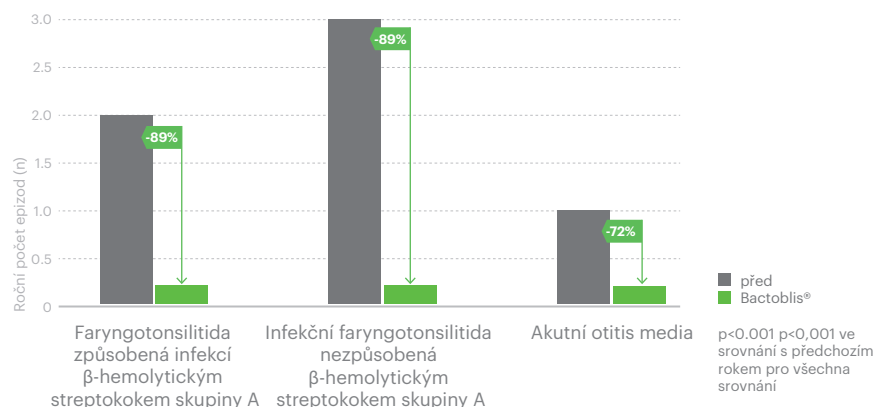
Cíl: Vyhodnotit schopnost přípravku Bactoblis® snížit incidenci streptokokových a virových faryngotonsilitid a akutní otitis media při podávání ve dvou samostatných trimestrech (říjen až prosinec a duben až červen) u dětí s nerekurentní streptokokovou infekcí.

Metody: Retrospektivní observační studie u dětí ve věku 3 až 14 let bez anamnézy faryngotonsilitidy způsobené infekcí β-hemolytickým streptokokem skupiny B a akutní otitis media, které užívaly přípravek Bactoblis® (n=133) po dobu dvou trimestrů. Během

12měsíční léčby následovalo po každém léčebném období 3měsíční sledování.

Výsledky: Použití přípravku Bactoblis® snížilo incidenci faryngotonsilitidy o ~90% (p<0,001) a akutní otitis media o ~70% (p<0,001) při podávání po dobu dvou trimestrů z 12 měsíců.

Závěr: Bactoblis® snížil incidenci faryngitidy a akutní otitis media u dětí s nerekurentní streptokokovou infekcí.



Bactoblis® zkracuje délku antibiotické a antipyretické léčby

Použití *Streptococcus salivarius* K12 za účelem snížení incidence faryngo-tonsilitidy a akutní otitis media u dětí: retrospektivní analýza u nerecurrentních pediatrických pacientů

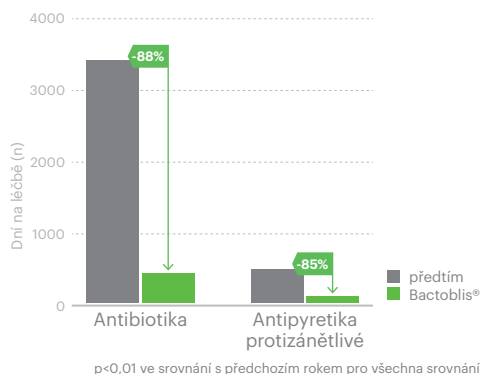
Minerva Pediatrica¹⁶

Cíl: Vyhodnotit schopnost přípravku Bactoblis® snížit incidenci streptokokových a virových faryngotonsilitid a akutní otitis media při podávání ve dvou samostatných trimestrech (říjen až prosinec a duben až červen) u dětí s nerecurrentní streptokokovou infekcí.

Metody: Retrospektivní observační studie u dětí ve věku 3 až 14 let bez anamnézy faryngotonsilitidy v důsledku infekce β -hemolytickým streptokokem skupiny A a akutní otitis media, které dostávaly přípravek Bactoblis® (n=133) po dobu dvou trimestrů. Během 12měsíční léčby následovalo po každém léčebném období 3měsíční sledování.

Výsledky: Bactoblis® významně snížil použití antibiotik a antipyretik / protizánětlivých léků o >80 % při podávání po dobu dvou trimestrů z 12 měsíců.

Závěr: Použití přípravku Bactoblis® významně snižuje použití antipyretik, antibiotik a protizánětlivých léků.



Použití přípravku Bactoblis® v prevenci streptokokové a virové faryngotonsilitidy u dětí

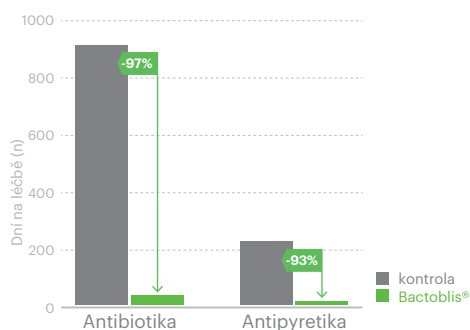
Drug Healthcare and patient Safety¹³

Cíl: Vyhodnotit schopnost přípravku Bactoblis® snížit incidenci streptokokové i virové faryngitidy a/nebo tonsilitidy u dětí.

Metody: Multicentrické otevřené nerandomizované kontrolované klinické hodnocení bylo provedeno u 61 dětí (31. 1 až 30. 4. 2013) v délce 90 dní. 30 dětí užívalo přípravek Bactoblis® a 30 bylo neléčených kontrol. Byla provedena studie s cílem vyhodnotit pokles počtu dní se zavedenou antibiotickou a antipyretickou terapií a počtu dní mimo školy (dětí) a práce (rodiče).

Výsledky: Počet dní, po které byly děti léčeny antibiotiky nebo antipyretiky, byl 30, resp. 16 v léčené skupině. Antipyretika byla podávána po dobu 6 dní na bolest/horečku v důsledku streptokokové infekce a 10 dní ze stejných důvodů, ale na virovou infekci. V kontrolní skupině bylo 900 dní na antibiotické terapii a 228 dní na antipyretické terapii.

Závěr: Profylaktické podávání přípravku Bactoblis® u dětí s anamnézou rekurentního orálního streptokokového onemocnění vedlo k významnému poklesu počtu dní s antibiotickou a/nebo antipyretickou terapií.



Bactoblis® efektivně snížil počet epizod rekurentní streptokokové faryngotonsilitidy a akutní otitis media u dětí a dospělých a účinky přetrvávaly po dobu 6 až 12měsíčního následného sledování.

Předběžné pediatrické klinické vyhodnocení orálního probiotika Bactoblis® v prevenci rekurentní faryngitidy a/nebo tonsilitidy v důsledku *Streptococcus pyogenes* a rekurentní akutní otitis media

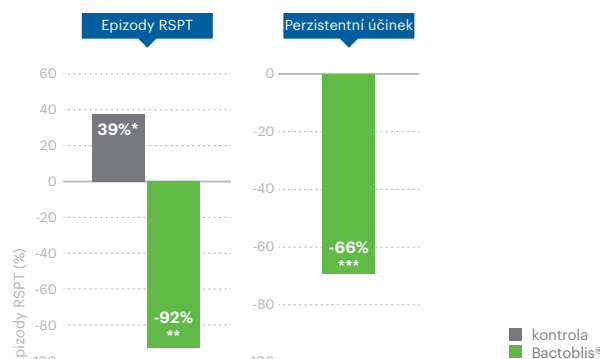
International Journal of General Medicine¹²

Cíl: Otestovat účinnost přípravku Bactoblis® ve snižování incidence streptokokové faryngitidy a/nebo tonsilitidy a akutní otitis media.

Metody: Nerandomizované kontrolované hodnocení zahrnovalo děti s rekurentní streptokokovou faryngotonsilitidou a akutní otitis media nebo bez nich. Bactoblis® (n=45), s neléčenou kontrolou (n=20), byl podáván po dobu 90 dní, následné sledování trvalo 6 měsíců.

Výsledky: Pacienti, kteří byli léčeni přípravkem Bactoblis®, měli nižší počet epizod streptokokových faryngeálních infekcí (asi 90 %) a/nebo akutní otitis media (asi 40 %) a také sníženou incidenci infekcí faryngu a ucha o asi 66 % během období následného sledování bez vedlejších účinků nebo předčasných ukončení účasti.

Závěr: Profylaktické podávání přípravku Bactoblis® dětem s anamnézou rekurentní streptokokové faryngotonsilitidy snížilo počet epizod streptokokových faryngitid a/nebo tonsilitidy a epizod akutní otitis media.



Klinické vyhodnocení orálního probiotika Bactoblis® v prevenci rekurentní faryngitidy a/nebo tonsilitidy v důsledku *Streptococcus pyogenes* u dospělých

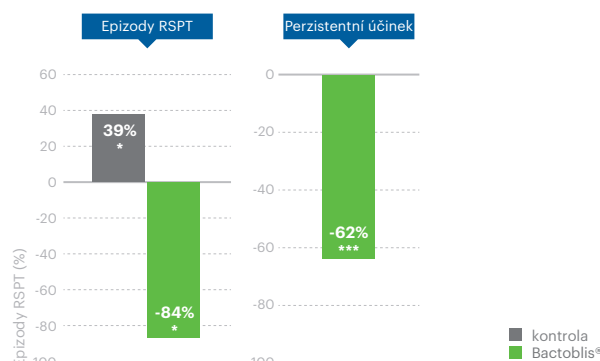
Expert Opinion on Biological Therapy¹⁷

Cíl: Byla testována účinnost přípravku Bactoblis® v prevenci streptokokové faryngitidy a/nebo tonsilitidy u dospělých.

Metody: Randomizované kontrolované hodnocení u dospělých s rekurentní streptokokovou faryngotonsilitidou, kteří dostávali přípravek Bactoblis® (n=20), a neléčených kontrol (n=20), s dobou léčby 90 dní a následným sledováním po dobu 6 měsíců.

Výsledky: Pokles výskytu epizod streptokokové faryngeální infekce o asi 80 %. Během následného sledování bylo hlášeno přibližně 60% snížení incidence faryngitidy. Nebyly hlášeny žádné vedlejší účinky spojené s léčbou ani předčasná ukončení studie.

Závěr: Profylaktické podávání přípravku Bactoblis® u dospělých s anamnézou rekurentní orální streptokokové patologie snížilo počet epizod streptokokových faryngeálních infekcí a/nebo tonsilitid.



Pokles výskytu faryngotonsilárních infekcí způsobených β -hemolytickým streptokokem skupiny A spojených s použitím orálního probiotika Bactoblis®: retrospektivní observační studie

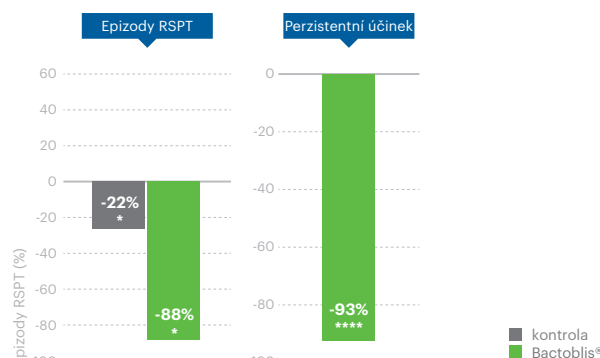
Expert Opinion on Biological Therapy¹⁸

Cíl: Vyhodnotit výskyt faryngotonsilárních infekcí způsobených β -hemolytickým streptokokem skupiny A u dětí s nedávnou anamnézou rekurentních epizod po podání přípravku Bactoblis®.

Metody: Retrospektivní observační studie u dětí s rekurentní streptokokovou faryngotonsilitidou, které dostávaly přípravek Bactoblis® (n=76), a neléčených kontrol (n=54), s dobou léčby 90 dní a následným sledováním po dobu 6 měsíců.

Výsledky: Po následném sledování byla pravděpodobnost rozvoje nových infekcí způsobených β -hemolytickým streptokokem skupiny A významně nižší ($p < 0,001$) než před zahájením léčby. Pacienti užívající přípravek Bactoblis® měli významně méně faryngotonsilárních infekcí způsobených β -hemolytickým streptokokem skupiny A, a to během profylaxe i následného sledování ($p < 0,001$).

Závěr: Použití probiotika Bactoblis® kontrolovalo rekurentní faryngo-tonsilární infekce způsobované β -hemolytickými streptokoky skupiny A u dětí a snížilo spotřebu antibiotik.



Pokles byl vypočten jako pokles (%) = (děti bez příhody [n] / celkový počet dětí na skupinu) x 100 nebo pokles (%) = (1-OR) x 100

* $p < 0,001$ vs. epizody v předchozích letech, ** $p < 0,0001$ vs. epizody v předchozích letech, *** $p < 0,005$ vs. pokles epizod u neléčených kontrol, **** $p < 0,001$ vs. pokles epizod u neléčených kontrol

- Negativní znaménko označuje pokles, RSPT: rekurentní streptokoková faryngo-tonsilitida

Léčba přípravkem Bactoblis® jako doplňková terapie ke konvenční terapii antibiotiky a protizánětlivými léky je efektivnější než samostatná konvenční terapie u dětí s rekurentní tonsilitidou

Efektivita respiračního probiotika *Streptococcus salivarius* K12 u dětí s rekurentní tonsilitidou

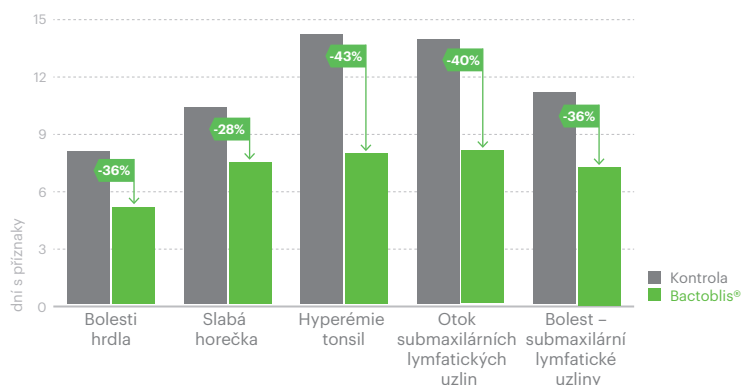
Actual Infectology²⁸

Cíl: Rekurentní tonsilitida (RT) je běžná ve všech věkových skupinách, ale nejvyšší incidence je pozorována v pediatrické populaci kvůli morfologické nezralosti tonsil a nedokončenému vývoji imunologických funkcí v dětském těle ve spojení s věkem. Nejslibnější oblastí v terapii RT je v současnosti použití perorálních probiotik inhibujících *Streptococcus pyogenes*, jeden z nejvýznamnějších patogenů v dutině ústní.

Metody: 35 dětí ve věku 5–15 let ($9,2 \pm 2,9$ let) s rekurentní tonsilitidou bylo rozděleno do dvou skupin. Pacienti ve srovnávací skupině (15 lidí) dostalo konvenční terapii (dle standardních indikací antibiotik, nesteroidních antiflogistik, lokálních antiseptik) během relapsů rekurentní tonsilitidy. Pacienti (20 lidí) v hlavní skupině kromě toho užívali 1 pastilku Bactoblis® denně po dobu 30 dní.

Výsledky: U obou skupin došlo k významnému zlepšení příznaků po léčbě přípravkem Bactoblis®. Děti ve skupině Bactoblis® však měli mimo jiné o 36 % méně dní s bolestí krku, o 28 % méně dní s horečkou, o 43 % méně dní s hyperémií tonsil a o 40 % méně dní s otokem lymfatických uzlin ve srovnání se skupinou na konvenční terapii.

Závěr: Doplňková terapie přípravkem Bactoblis® ke konvenční terapii antibiotiky a protizánětlivými léky je efektivnější než samostatná konvenční terapie.



Kontrola = konvenční terapie včetně antibiotik a antiflogistik

Použití přípravku Bactoblis® ke snížení incidence faryngo-tonsilidy a akutní otitis media u dětí: retrospektivní analýza u nerecurrentních pediatrických pacientů

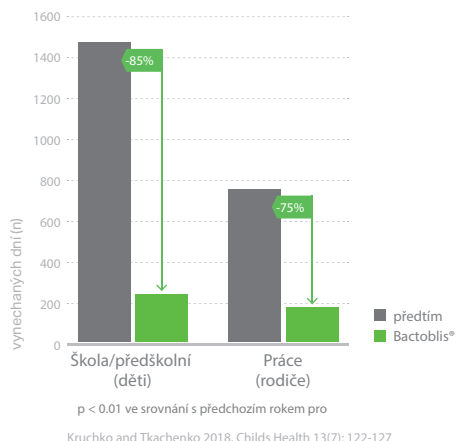
Minerva Pediatrica³⁰

Cíl: Vyhodnotit schopnost přípravku Bactoblis® snížit incidenci streptokokových a virových faryngotonsilitid a akutní otitis media při podávání ve dvou samostatných trimestrech (říjen až prosinec a duben až červen) u dětí s nerecurrentní streptokokovou infekcí.

Metody: Retrospektivní observační studie u dětí ve věku 3 až 14 let bez anamnézy faryngotonsilitidy v důsledku infekce β -hemolytickým streptokokem skupiny A a akutní otitis media, které dostávaly přípravek Bactoblis® (n=133) po dobu dvou trimestrů. Během 12měsíční léčby následovalo po každém léčebném období 3měsíční sledování.

Výsledky: Bactoblis® významně snížil počet vynechaných dní ze školy dětmi nebo z práce dospělými o asi 85 %, resp. 75 %, při podávání po dobu dvou trimestrů z 12 měsíců.

Závěr: Použití přípravku Bactoblis® vedlo ke snížení počtu vynechaných dní předškolní, školní docházky a z práce.



Použití přípravku Bactoblis® v prevenci streptokokové a virové faryngotonsilitidy u dětí

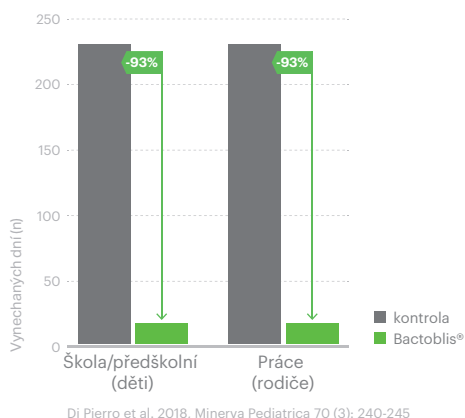
Drug Healthcare and patient Safety¹³

Cíl: Vyhodnotit schopnost přípravku Bactoblis® snížit incidenci streptokokové i virové faryngitidy a/nebo tonsilitidy u dětí.

Metody: Multicentrické otevřené nerandomizované kontrolované klinické hodnocení bylo provedeno u 61 dětí (31. 1 až 30. 4. 2013) v délce 90 dní. 30 dětí užívalo přípravek Bactoblis® a 30 bylo neléčených kontrol. Byla provedena studie s cílem vyhodnotit pokles počtu dní se zavedenou antibiotickou a antipyretickou terapií a počtu dní mimo školy (dětí) a práce (rodiče).

Výsledky: Vynechané školní dny (dětí: 16 vs 228), dny v práci (rodiče: 16 vs 228) se snížily s přípravkem Bactoblis® ve srovnání s kontrolou.

Závěr: Profylaktické podávání přípravku Bactoblis® u dětí s anamnézou rekurentního orálního streptokokového onemocnění vedlo k významnému poklesu absence ze školy nebo práce.



Bactoblis® také snížil počet plánovaných adenotonsilektomií

Pilotní studie s cílem vyhodnotit účinnost orálního probiotika Bactoblis® v prevenci rekurentních faryngotonsilárních epizod u pediatrických pacientů

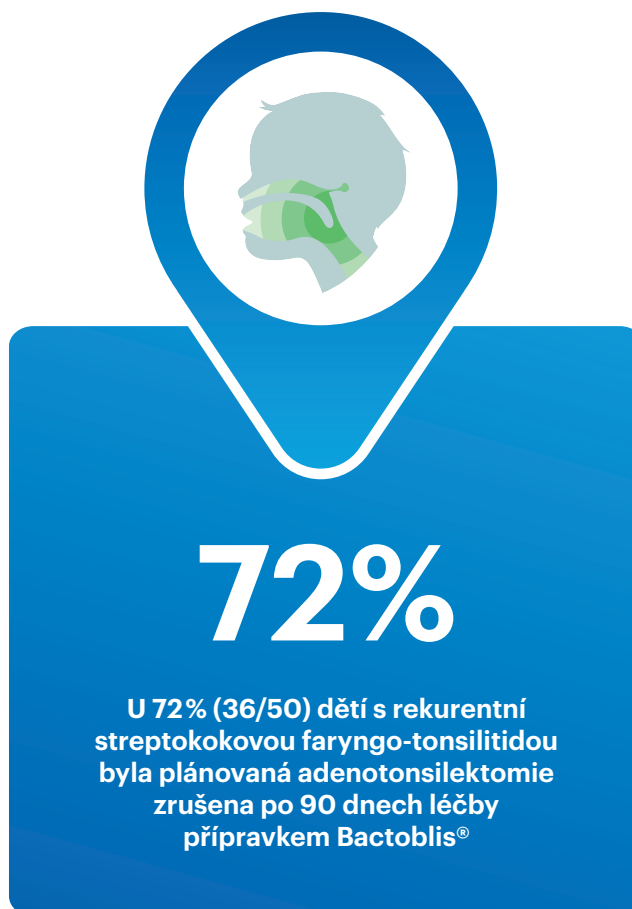
International Journal of General Medicine¹⁹

Cíl: Tato studie srovnává profylaktickou účinnost přípravku Bactoblis® u léčených dětí s rekurentní faryngotonsilitidou s neléčenou skupinou.

Metody: Tato prospektivní randomizovaná otevřená a monocentrická studie byla provedena u dětí (n=100) s rekurentní streptokokovou faryngo-tonsilítidou. Z této skupiny dostalo 50 dětí Bactoblis® ve srovnání s neléčenou kontrolou (n=50) po dobu 90 dní a bylo sledováno po dobu 12 měsíců. Byla hodnocena recurence faryngo-tonsilárních epizod, konkomitanti použití jiných léků, tolerabilita léčby, klinické zlepšení, počet dní absence ze školy, snížené použití standardních terapií a vyřazení ze seznamu plánovaných chirurgických zákroků.

Výsledky: Ve skupině Bactoblis® 72 % (36/50) dětí zrušilo adenotonsilektomii ve srovnání se 100% (50/50) v neléčené skupině, které podstoupily zákrok po 90 dnech.

Závěr: Bactoblis® efektivně snížil chirurgické plánování pro faryngotonsilitidu.



Bactoblis® efektivně snižuje výskyt virových faryngitid a faryngotonsilitid u dětí indukci interferonu gama (IFN- γ) a snížením virového titru během virových infekcí

Pozitivní klinické výsledky odvozené od použití přípravku Bactoblis® k prevenci faryngotonsilitidy u dětí: pilotní výzkum.

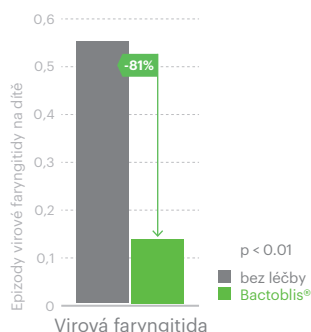
Drug, Healthcare and Patient Safety²⁵

Cíl: Vyhodnotit účinek přípravku Bactoblis® proti různým streptokokovým a nestreptokokovým infekcím.

Metody: Toto multicentrické otevřené nerandomizované kontrolované klinické hodnocení bylo provedeno u pediatrických subjektů (N=124). Z nich u 48 dětí byla zjištěna anamnéza rekurentní streptokokové faryngotonsilitidy a byly léčeny přípravkem Bactoblis® po dobu 3 měsíců, s následným sledováním po dobu 9 měsíců. Další skupina dětí (n=76), kterým předtím nebyla diagnostikována rekurentní streptokoková faryngotonsilitida, sloužila jako kontroly po stejné období. Studie hodnotila účinnost přípravku Bactoblis® na snížení výskytu tracheitid, virových faryngitid, rinitid, chřipky, laryngitid, akutních otitis media a stomatitid u dětí.

Výsledky: Epizody virové faryngitidy na dítě významně ($p < 0,01$) poklesly po 9 měsících následného sledování po léčbě přípravkem Bactoblis® ve srovnání s neléčenými kontrolami.

Závěr: Použití přípravku Bactoblis® pomáhá poskytovat ochranný účinek proti virové faryngitidě u dětí s anamnézou rekurentní streptokokové faryngotonsilitidy.



Použití přípravku Bactoblis® v prevenci streptokokové a virové faryngotonsilitidy u dětí

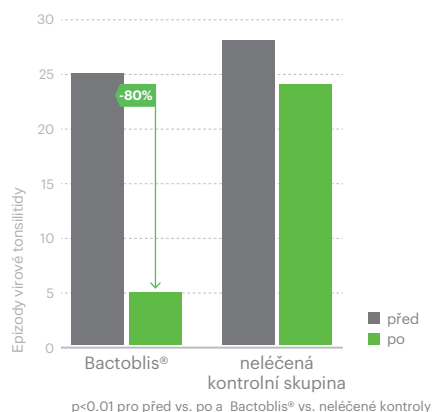
Drug, Healthcare and Patient Safety¹³

Cíl: Vyhodnotit schopnost přípravku Bactoblis® snížit incidenci streptokokové i virové faryngotonsilitidy u dětí.

Metody: Toto multicentrické otevřené nerandomizované kontrolované klinické hodnocení bylo provedeno u 61 dětí (31. 1 až 30. 4. 2013) v délce 90 dní. 30 dětí užívalo přípravek Bactoblis® a 30 bylo neléčených kontrol. Studie hodnotila účinnost přípravku Bactoblis® na snížení výskytu virových faryngo-tonsilárních infekcí.

Výsledky: Léčba přípravkem Bactoblis® snížila počet epizod virových orofaryngeálních infekcí o 80%, v kontrolní skupině bylo pozorováno asi 14% snížení ($p < 0,01$).

Závěr: Profylaktické podávání přípravku Bactoblis® u dětí vedlo k významnému poklesu epizod virových infekcí.



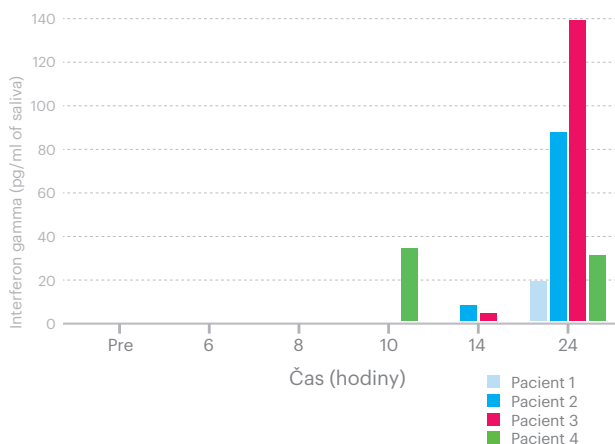
Zvýšené hladiny interferonu gama v lidských slinách po požití přípravku Bactoblis®

Poster presented at Joint New Zealand and Australian Microbiological Societies Annual Meeting, 2005²¹

Chincott et al., 200522 studovali účinky přípravku Bactoblis® u 4 dospělých s chřipkovitými příznaky. Pacienti dostávali pastilky Bactoblis® a jejich sliny byly hodnoceny před požitím a 6, 8, 10, 14 a 24 hodin po požití pastilek. Během virové infekce se titr viru normálně zvyšuje během prvních dvou dní a zvýšení hladin interferonu během této doby vede ke snížení virového titru.

V této studii byly pozorovány zvýšené hladiny IFN- γ (22 až 139 pg) v lidských slinách 24 hodin po požití přípravku Bactoblis®.

Z toho důvodu může indukce IFN- γ požitím přípravku Bactoblis® pomoci bránit dalšímu rozvoji příznaků virových infekcí.



Bactoblis® snižuje přítomnost klíčových patogenů u dětí a kojenců s dysbiotickými poruchami v dutině ústní a horních cestách dýchacích

Korekce dysbiotických poruch v dutině ústní u dětí s juvenilní revmatoidní artritidou

Účinnost přípravku Bactoblis® na léčbu dysbiotických poruch v dutině ústní u dětí ve věku 1 až 18 let s juvenilní revmatoidní artritidou byla hodnocena týmem Ilchenko et al., 2018²² v observační studii (N=25). 30denní používání přípravku Bactoblis® vedlo k významnému poklesu ($p < 0,05$) ústní kolonizace podmíněně patogenní mikroflorou - *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*,

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* a *Candida albicans*. Výsledky této studie svědčí pro pozitivní efekt na mikrobiom dutiny ústní u dětí s klinickými známkami juvenilní revmatoidní artritidy po profylaktickém používání přípravku Bactoblis®.

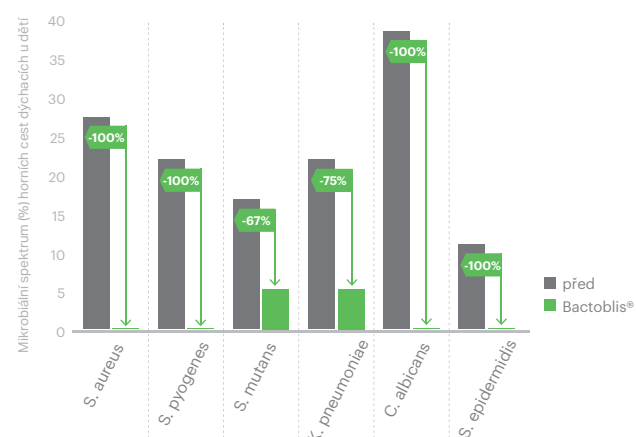
Pozitivní účinky na mikrobiom horních cest dýchacích u dětí a kojenců s mikroaspiračním syndromem²³

Ilchenko et al., 2019²³ provedli observační studii s cílem vyhodnotit účinnost probiotika Bactoblis® na mikrobiom dýchacích cest u 46 lidí (ve věku 6 měsíců až 7 let) s mikroaspiračním syndromem. Mezi nimi 8 dětí (průměrný věk: $4,60 \pm 0,04$ let) mělo mikroaspirační syndrom s anamnézou protražované a rekurentní bronchitidy a 28 dětí (průměrný věk: $1,15 \pm 0,39$ let) mělo ruminace a anamnézou 2 nebo více akutních respiračních onemocnění za rok. Výsledky bakteriologické studie prokázaly, že gram-negativní mikroorganismy (44,5 %) dominovaly orofaryngeální mikrobiom u dětí s mikroaspiračním syndromem. Nejčastější zástupci střevní oportunní mikroflóry byli *Klebsiella pneumoniae* (22,2 %), *Proteus vulgaris* a *Proteus spp.* (16,7 %) a méně často *Escherichia coli* (5,6 %). Kvasinkové houby rodu *Candida* byly izolovány u 38,9 % pacientů. V orofaryngeálním mikrobiomu v druhé skupině dětí s ruminací dominovala gram-pozitivní flóra: *Staphylococcus aureus* (46,4 %) a *Streptococcus pyogenes* (35,7 %). Používání přípravku Bactoblis® po dobu 1 měsíce mělo pozitivní vliv na složení mikrobiomu na sliznici horních cest dýchacích, co bylo charakterizováno významným poklesem kolonizace *Staphylococcus aureus* (-100 %), *Streptococcus pyogenes* (-100 %), *Klebsiella pneumoniae* (-74,7 %) a eliminací *Proteus vulgaris* (-100 %) a *Proteus spp.* (-100 %) a *Candida albicans* (-100 %).

Ilchenko et al., 2019b²⁴ také provedli studii s cílem vyhodnotit účinnost přípravku Bactoblis® na korekci dysbiotických poruch sliznic horních cest dýchacích u dětí s ruminací a mikroaspirací. Mezi nimi 18 dětí (průměrný věk: $4,60 \pm 0,04$ let) mělo protražovanou a rekurentní bronchitidu, 12 (průměrný věk: $1,20 \pm 0,04$ let) mělo regurgitaci s anamnézou rekurentních respiračních virových infekcí a 16 dětí (průměrný věk: $13,3 \pm 8,9$ měsíců) mělo respirační příznaky s ruminací. Mikroflóra horních cest dýchacích u dětí s regurgitací a anamnézou rekurentních respiračních virových infekcí byla dominantně gram-pozitivní: *Staphylococcus aureus* (66,7 %) a *Streptococcus pyogenes* (83,3 %). Podávání přípravku Bactoblis® ve dvou opakovaných cyklech po 30 dnech s intervalem 3 měsíců u dětí s ruminací

a mikroaspiračními syndromy mělo významný pozitivní účinek na mikrobiální složení horních cest dýchacích, co bylo charakterizováno významným poklesem kolonizace patogeny (*Staphylococcus aureus* [-62,5 %] a *Streptococcus pyogenes* [-60 %]; $p < 0,05$).

Malé děti se syndromem ruminace mají riziko mikroaspiračního syndromu a rekurentních respiračních onemocnění. Doporučuje se, že příslušnou korekci dysbiózy ve sliznici horních cest dýchacích u malých dětí lze vytvořit optimální podmínky pro obnovu mikrobiomu v dutině ústní a horních cestách dýchacích. Po perorálním podání přípravku Bactoblis® dochází k ústupu dysbiózy a její přítomnost v těle poté přetrvává po dlouhou dobu. Předepsání přípravku může udržovat zdravý mikrobiom na sliznicích horních cest dýchacích a snižuje riziko rekurentních respiračních onemocnění u dětí a kojenců s mikroaspiračním syndromem.



Redukce klíčových patogenů u dětí s rekurentní tonsilitidou

Kryunchko a Tkanchenko, 2017²⁵ provedli otevřenou nerandomizovanou klinickou studii u 66 dětí s rekurentními infekcemi horních cest dýchacích. Výsledky z této studie prokázaly významný pokles kolonizace *Hemophilic bacillus*, *Staphylococcus aureus* a *Pneumococcus* sliznic orofaryngu dětí, které dostávaly přípravek Bactoblis® po dobu 30 dnů.

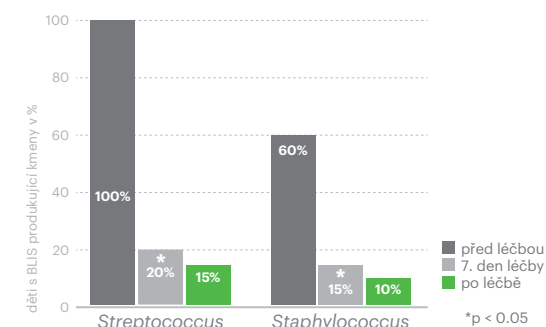
Kontrolovaná prospektivní otevřená randomizovaná studie na jednom pracovišti (Gavrilenco 2018²⁶) zahrnovala 57 pediatrických pacientů (ve věku 6 až 10 let) s rekurentním faryngeálním onemocněním. Autoři uvádí, že po 30 dnech léčby přípravkem Bactoblis® došlo k významnému poklesu kolonizace *Staphylococcus aureus* (33 % na 6,6 %) a *Streptococcus pneumoniae* (20 % na 0 %) ve studované populaci. Bactoblis® tudíž přispěl ke snížení množství klíčových patogenů a zlepšil mikrobiocenózu patrových tonsil u dětí s rekurentním onemocněním faryngu.

Výsledky z observační studie (N=54) provedené týmem Marushko et al. 2018²⁷ dokládají pokles počtu izolací *Staphylococcus aureus* ($48,2 \pm 6,8$ až $21,6 \pm 5,8$) a β -hemolytických streptokoků skupiny A (samostatně [$33,3 \pm 6,4$ až $10,9 \pm 4,6$] a spolu se *Staphylococcus aureus* [$14,8 \pm 4,8$ až $4,3 \pm 3,0$]) u dětí s chronickou tonsilitidou (N=54, věk 9 až 14 let) po léčbě přípravkem Bactoblis® (vše $p < 0,05$).

Ilchenko et al., 2020²⁸ provedli komplexní vyšetření 35 dětí (ve věku 5 až 15 let), které byly randomizovány do konvenční terapie (n=15) nebo konvenční terapie plus Bactoblis® (n=20). Doplnění přípravku Bactoblis® po dobu měsíce přispělo k významnému zlepše-

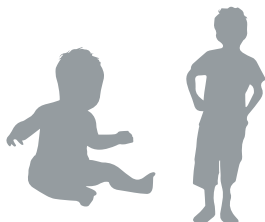
ní mikrobiomu horních cest dýchacích, co bylo charakterizováno významným poklesem kolonizace *Streptococcus pyogenes* (-80 %) a *Staphylococcus aureus* (-45 %) v den 7 léčby a tento účinek přetrvával až 1 měsíc.

Celkově Bactoblis® podpořil odstranění patogenní mikroflóry a pomohl obnovit přirozený mikrobiom sliznic dutiny ústní a horních cest dýchacích, který hraje významnou roli v ochraně těla před patogenními a podmíněně patogenními bakteriemi. Z toho důvodu může profylaktické použití přípravku Bactoblis® vést k pozitivnímu a korektivnímu účinku na mikrobiom dětí a kojenců s anamnézou streptokokové tonsilofaryngitidy nebo dysbiotických poruch dutiny ústní a horních cest dýchacích.



Bactoblis® má odlišná složení pro všechny věkové skupiny

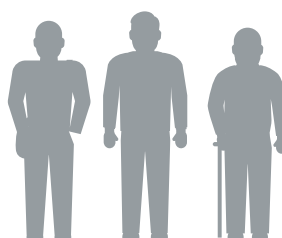
Bactoblis® sáčky



Bactoblis 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 děti od 1 roka
30 sáčků vrecušok
Obsahuje patentované probiotikum a prebiotikum
ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNÍ MIKROBIOTA

jsou vhodnější pro kojence a děti, jelikož snižují riziko vdechnut a umožňují kolonizaci *Streptococcus salivarius* K12 v dutině ústní a nosohltanu malých dětí.²⁹

Bactoblis® Tablety



Bactoblis 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 děti od 1 roka
30 sáčků vrecušok
Obsahuje patentované probiotikum a prebiotikum
ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNÍ MIKROBIOTA

Bactoblis 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 děti od 1 roka
30 sáčků vrecušok
Obsahuje patentované probiotikum a prebiotikum
ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNÍ MIKROBIOTA

jsou účinné a dobře tolerované dětmi a dospělými, jelikož zajišťují dlouhodobý účinek s přirozenými a bezpečnými úrovněmi kolonizace *Streptococcus salivarius* K12.⁷

Souhrn

***Streptococcus salivarius* K12**

- ✓ Pomáhá budovat přirozenou obranu první linie ihned po narození.
- ✓ Působí kompetitivní vazbou na buněčné receptory, které by se jinak vázaly na bakterie a viry
- ✓ Tvoří bakteriocin, který disponuje BLIS aktivitou: Salivaricin A2 a Salivaricin B.



Streptococcus salivarius K12 je hlavní účinnou složkou přípravku Bactoblis® a jeho použití je bezpečné a účinné v léčbě rekurentních bolestí hrdla, tonsilitidy a infekcí středního ucha u kojenců, dětí a dospělých

KLINICKÉ VÝHODY



**Nižší incidence
infekcí ucha
a hrdla**



**Kratší terapie
antibiotiky
a antipyretiky**



**Méně
rekurentních
infekcí**



**Méně dní
vynechaných ze
školy a práce**



**REKURENTNÍ
BOLESTI KRKU
A TONSILITIDY**



**INFEKCE
STŘEDNÍHO
UCHA**

Literatura

1. Wang Y, Li X, Ge T, et al. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95:e4509.
2. Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics History. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S116 S119.
3. Lu M, Xuan S, Wang Z. Oral microbiota: A new view of body health. *Food Sci Hum Wellness*. 2019;8:8-15.
4. Burton JP, Wescombe PA, Cadieux PA, Tagg JR. Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci? *Benef Microbes*. 2011;2:93-101.
5. 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;4:819-35.
6. Burton JP, Wescombe PA, Moore CJ, Chilcott CN, Tagg JR. Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:3050-3.
7. Burton JP, Chilcott CN, Wescombe PA, Tagg JR. Extended safety data for the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2010;2:135-44.
8. Hols, P et al. Mobilization of microbiota commensals and their bacteriocins for therapeutics. *Trends Microbiol* 2019;27:690-702.
9. Wescombe PA, Upton M, Dierksen KP, Ragland NL, Sivabalan S, Wirawan RE, Inglis MA, Moore CJ, Walker GV, Chilcott CN, Jenkinson HF, Tagg JR. Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Appl Environ Microbiol*. 2006;72:1459-66.
10. Di Piero F, Colombo M, Giuliani MG, Danza ML, Basile I, Bollani T, Conti AM, Zanvit A, Rottoli AS. Effect of administration of *Streptococcus salivarius* K12 on the occurrence of streptococcal pharyngo-tonsillitis, scarlet fever and acute otitis media in 3 years old children. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:4601-6.
11. Egan K, Ross RP, Hill C. Bacteriocins: antibiotics in the age of the microbiome. *Emerg Top Life Sci*. 2017;1:55-63.
12. Di Piero F, Donato G, Fomia F, Adami T, Careddu D, Cassandro C, Albera R. 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.
13. Di Piero F, Colombo M, Zanvit A, Rizzo P, Rottoli AS. Use of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of streptococcal and viral pharyngotonsillitis in children. *Drug Healthc Patient Saf*. 2014;6:15-20.
14. Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, Gardy JL, Chikatarla A, Gellatly S, Lorraine LY, Pistolic J, Falsafi R, Tagg J, Hancock RE. The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infect Immun*. 2008;76:4163-75.
15. 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;22:126-30.
16. Di Piero F, Rizzo P, Poggi E, Timitilli A, Bolloli S, Bruno M, Caneva E, Campus R, Giannattasio A. Use of *Streptococcus salivarius* K12 to reduce the incidence of pharyngo-tonsillitis and acute otitis media in children: a retrospective analysis in not-recurrent pediatric subjects. *Minerva Pediatr*. 2018;70:240-5.
17. 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;13:339-43.
18. Gregori G, Righi O, Rizzo P, Boiardi G, Demuru G, Ferzetti A, Galli A, Ghisoni M, Lenzini S, Marengi C, Mura C, Sacchetti R, Suzzani L. Reduction of group A beta-haemolytic streptococcus pharyngo-tonsillar infections associated with use of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: a retrospective observational study. *Ther Clin Risk Manag*. 2016;12:87-92.
19. Marini G, Sitzia E, Panatta ML, De Vincentiis GC. Pilot study to explore the prophylactic efficacy of oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngo-tonsillar episodes in pediatric patients. *Int J Gen Med*. 2019;12:213-7.
20. Di Piero F, Colombo M, Zanvit A, Rottoli AS. Positive clinical outcomes derived from using *Streptococcus salivarius* K12 to prevent streptococcal pharyngo-tonsillitis in children: a pilot investigation. *Drug Healthc Patient Saf*. 2016;8:77-81
21. Chilcott C, Crowley L, Kulkani V, Jack RW, McLellan AD, Tagg J. Elevated levels of interferon gamma in human saliva following ingestion of *Streptococcus salivarius* K12. Presented at: Joint New Zealand and Australian Microbiological Societies Annual Meeting. Dunedin, New Zealand, 22-25 November 2005.
22. Ilchenko SI, Fialkovska AA, Ivanus SG. The effectiveness application of the respiratory probiotic *Streptococcus salivarius* K12 for the correction of dysbiotic oral cavity disorders in children with juvenile rheumatoid arthritis. *Clinical Immunology Allergology Infectology* 2019;3(116):30-32.
23. Ilchenko SI, Fialkovska AA, Mozheiko TV. Prevention of recurrent respiratory diseases in children with microaspiration syndrome *Pediatrics Eastern Europe* 2019;7:558-565
24. Ilchenko SI, Fialkovska AA, Mozheiko TV. Mozheiko. Modern possibilities of correcting dysbiotic disorders of the mucous membranes of the upper respiratory tract in infants. *Clinical Pediatrics. Eastern Europe* 2019;7(4):558-565.
25. Kruchko TO, Tkachenko OYa Possibilities of using lantibiotics in the prevention of recurrent upper respiratory tract infections in children. *Childs Health* 2017;12:27-32.
26. Havrylenko Yu V. Current benefits of lantibiotics use in prevention of recurrent pharyngeal infections in children *Childs Health* 2018;8:82-94.
27. Marushko TV, Hliadielova NP, Onufriiv O Ye. Clinico-immunological efficacy of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of exacerbations and treatment of chronic tonsillitis in children *Childs Health* 2018;13(8):82-88.
28. Ilchenko S.I., Fialkovskaya A.A.1, Ivanus S.G. The efficiency of respiratory probiotic *Streptococcus salivarius* K12 use in children with recurrent tonsillitis *Actual Infectology* 2020. 8(2): 35-39.
29. Power DA, Burton JP, Chilcott CN, Dawes PJ, Tagg JR. Preliminary investigations of the colonisation of upper respiratory tract tissues. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27:1261-3.
30. Kruchko and Tkachenko 2018, *Childs Health* 13(7): 122-127.

Bactoral



Tiskovina je určena pouze pro odbornou veřejnost

Nová klinická studie dokládá, že *Streptococcus salivarius* K12 snižuje výskyt infekcí SARS-CoV-2

Úvod

Infekce SARS-CoV-2 (běžně označovaná jako COVID-19) se stala vážnou hrozbou a vysoká infekčnost tohoto onemocnění zůstává významným problémem.

Dutina ústní je hlavní vstupní bránou SARS-CoV-2.

Nejnovější výzkum naznačuje významnou roli ústního a plicního mikrobiomu u infekcí SARS-CoV-2:

- pacienti s COVID-19 vykazují významně odlišnou skladbu ústních bakterií a zánětlivý profil, kdežto zdravé subjekty mají v mikrobiomu s ochrannými/příznivými vlivy přítomné stafylokoky¹
- dutina ústní se zdá být primárním zdrojem plicního mikrobiomu²
- srovnání pacientů se SARS-CoV-2 se zdravými subjekty odhalilo dysbiózu plicního mikrobiomu³

Fakta

Streptococcus salivarius K12 je komenzální druh zdravého mikrobiomu dutiny ústní, horních cest dýchacích a plic.⁴ Má následující doložené účinky:

- zlepšení dysbiózy mikrobiomu horních cest dýchacích^{5,6,7,8}
- přímá antivirová aktivita stimulací sekrecí INF-gama⁹
- ochrana před infekcemi horních cest dýchacích¹⁰⁻¹²

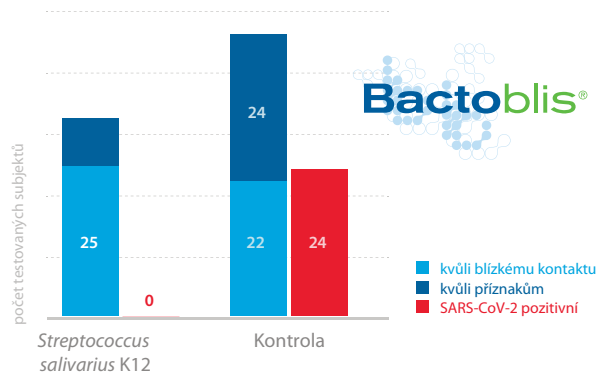
Metody

- 128 dětí navštěvujících školu (průměrný věk 8 let)
- s podáním *Streptococcus salivarius* K12 a bez podání *Streptococcus salivarius* K12 (kontrolní skupina) po dobu 90 dní
- jedna pastilka přípravku s *Streptococcus salivarius* K12 denně po dobu 90 dní
- nosní stěry za účelem detekce specifického antigenu SARS-CoV-2 provedené u příznaků COVID-19 a/nebo kontaktu s členem rodiny či spolužákem pozitivním na SARS-CoV-2

Výsledky

- excelentní přijetí a tolerabilita
- méně typické příznaky COVID-19 (např. horečka, bolesti hlavy, kašel) u subjektů léčených *Streptococcus salivarius* K12
- méně antigenních testů SARS-CoV-2 provedených u subjektů léčených *Streptococcus salivarius* K12 ve srovnání s kontrolami (33 vs. 46, $p = 0,04$) kvůli méně příznakům COVID-19

Obr. 1: specifické antigenní testy na SARS-CoV-2



- žádné ze subjektů léčených *Streptococcus salivarius* K12 neměly pozitivní antigenní test na SARS-CoV-2, kdežto 24 kontrolních subjektů mělo pozitivní výsledek

Závěr

***Streptococcus salivarius* K12 významně snižuje výskyt infekcí SARS-CoV-2.** *Streptococcus salivarius* K12 může chránit před COVID-19 děti vracující se do školy a školky i pracovníky s rizikem nozokomiální nákazy (nemocnice, ambulantní péče, cestování).

Literatura:

- lebbia V, et al. bioRxiv 2020. K dispozici na: <https://doi.org/10.1101/2020.12.13.422589>
- Wang J, et al. Sci China Life Sci. 2017;60(12):1407–1415
- Shen Z, et al. Clin Infect Dis. 2020;ciaa203
- Di Piero F. Minerva Med 2020;111(3):281–3
- Kruchko and Tkachenko 2017, Child's Health 12(8): 27–32
- Havrilenko 2018, Child's Health 13(8): 89–94
- Ilchenko et al. Clinical Immunology Allergy Infectology 3(116), 30–32, 2019
- Sarlin S, et al. Pediatr Infect Dis J. 2020 Dec 8. doi: 10.1097/INF.0000000000003016
- Chilcott CN, et al. Prezentováno na: Joint New Zealand and Australian Microbiological Societies Annual Meeting. Dunedin, Nový Zéland, 22–25. 11. 2005
- Di Piero et al. 2016a, Drug Healthc Patient Saf 8:77–81
- Di Piero et al. 2018, Minerva Pediatr 70(3): 240–245
- Di Piero et al. 2014, Drug Healthc Patient Saf 6: 15–20
- Kruchko and Tkachenko 2018, Child's Health 13(7): 122–127

NOVINKA

Zůstat zdraví během chřipkové sezony

Bactoral IMUNO

Lactobacillus paracasei, L. CASEI 431®
Streptococcus salivarius K12

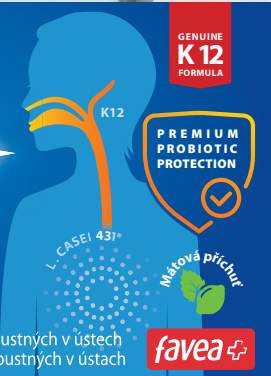
První kombinace probiotických kmenů kolonizujících
a chránících jak střevo, tak sliznice úst a hltanu.

doplňk 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

favea



Klíčové prvky

- ▷ slizniční imunitní systém je klíčový imunitní systém chránící téměř celý vnitřní povrch lidského těla od orofaryngeální dutiny až po gastrointestinální trakt
- ▷ první kombinace dobře dokumentovaných probiotických kmenů kolonizujících a chránících střevní (*L. paracasei*, *L. CASEI 431*®) a orofaryngeální sliznici (*S. salivarius* K12®)
- ▷ kombinace významných klinických důkazů pro ochranu dospělých před respiračními infekcemi a zkrácení trvání infekcí
- ▷ unikátní a patentované složení konečného produktu nabízejícího maximální ochranu před virovými respiračními infekcemi u dospělých
- ▷ přispívá k normální funkci imunitního systému
- ▷ nová příchut: máta yazu

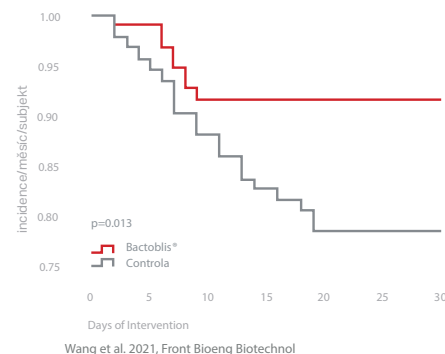
Výhody a indikace použití

- ▷ profylaxe infekcí dýchacích cest
- ▷ během chřipkové sezony
- ▷ stres
- ▷ expozice patogenům
- ▷ sportovci
- ▷ doplnění ochranné mikroflóry
- ▷ omezení použití antibiotik

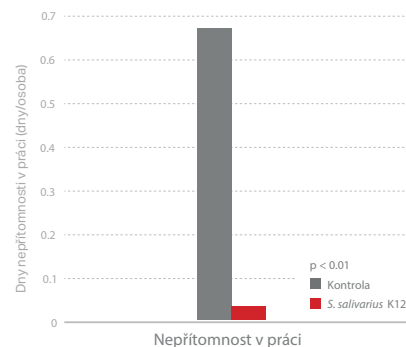
Jak používat

- ▷ jednou denně
- ▷ pomalu rozpustit v ústech
- ▷ po čištění zubů

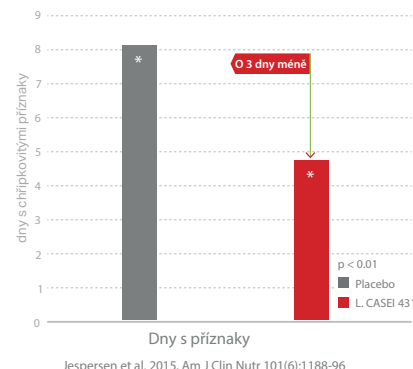
S. salivarius K12® chrání zdravé pracovníky před respiračními infekcemi



S. salivarius K12® snižuje nepřítomnost v práci v důsledku respiračních infekcí



L. CASEI 431® zkracuje délku respiračního diskomfortu



Fakta

- ▷ obsahuje nejsilnější ochranné přírodní probiotické kmeny pro prostředí lidských úst a střev^{1,2}
- ▷ kolonizace dutiny ústní, oro- a nasofaryngu^{3,4} a střeva⁵ zajišťující ochranu před patogeny a stimulaci imunitního systému
- ▷ přímá antibakteriální aktivita zajišťující ochranu před bakteriálními infekcemi⁶
- ▷ zvýšení hladiny IFN-gama ve slinách zajišťující ochranu před virovými infekcemi⁷ IFN-gama má zásadní význam pro přirozenou i získanou imunitu

proti virovým či bakteriálním infekcím. Význam IFN-gama spočívá v jeho schopnosti přímo inhibovat virovou replikaci a také celkově modulovat a stimulovat imunitní systém.

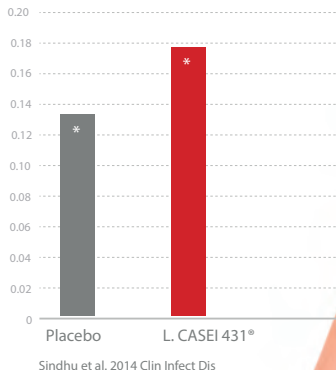
- ▷ stimulace tvorby protilátek svědčící pro zvýšenou imunitní odezvu⁸
- ▷ snížení incidence vzácných bakteriálních a virových infekcí^{9–13}
- ▷ zkrácení trvání respiračních infekcí⁹
- ▷ omezení použití antibiotik a doby absence v práci^{10, 14}

Tříúrovňová ochrana s Bactoral Imuno

2. úroveň – střevo

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

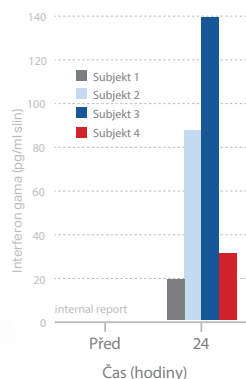
L. CASEI 431® zvyšuje imunitní odpověď na vakcinaci proti chřipce



1. úroveň – dutina ústní

působí v hlavním vstupním místě patogenů (bakterie a viry)

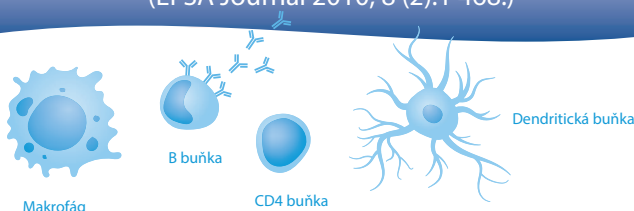
S. salivarius K12® stimuluje antivirovou ochranu v dutině ústní



Chilcott CN, et al. 2005, Joint New Zealand and Australian Microbiological Societies Annual Meeting

3. úroveň – systémová ochrana

Vitamin D přispívá k normální funkci imunitního systému (EFSA Journal 2010; 8 (2):1 468.)



favea +
pro vaše zdraví

**Váš štít proti
nachlazení a chřipce**

Bactoral
Lactobacillus paracasei, L. CASEI 431®
Streptococcus salivarius K12 **IMUNO**

**Zdraví dýchacích
cest**



L. CASEI 431® logo™ je ochranná známka společnosti Chr. Hansen A/S

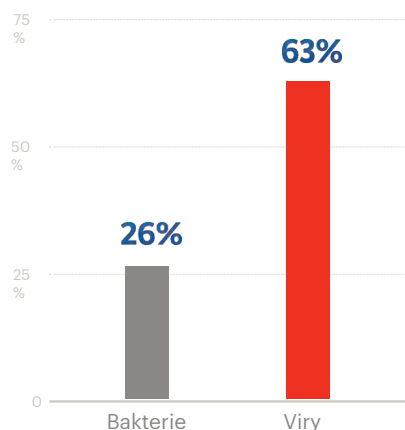
Patofyziologie a prevalence

Respirační infekce (RI) u dospělých

**Zánět krku/mandlí způsobený různými viry a bakteriemi,
které se dostávají do dutiny ústní a nosu**

Běžné nemoci	Virové infekce (rhinovirus, chřipka) převažují u dospělých
Bakteriální původ	U dětí 20–30 % (až 37 %) β-hemolytické streptokoky sérologické skupiny A (<i>S. pyogenes</i>) a u dospělých pouze 5–15 % GAS
Virový původ	Studie ve Spojeném království o prevalenci u dospělých: 63 % viry (chřipka) a 26 % bakterie

**Ochrana před infekcemi dýchacích cest u dospělých
může vyžadovat další podporu imunity**



Regoli et al. 2011; Wessels 2011; Creer et al. 2005

Bactoral
Lactobacillus paracasei, L. CASEI 431®
Streptococcus salivarius K12 **IMUNO**

Prémiová probiotická ochrana

Naše unikátní kombinace probiotik působí ve třech úrovních

2. úroveň

Stimuluje střevo

- Zabraňuje šíření virů:

Stimuluje největší imunitní orgán v těle: Zlepšuje systémové imunitní odpovědi (sérové protilátky, IgG)

- Zmírňuje příznaky



1. úroveň

Imunita sliznice dutiny ústní

- Chrání před počáteční infekcí:

Produkuje bakteriociny a stimuluje lokální sekreci antivirových protilátek (sIgA) a cytokinů (INF-γ) v místě hlavního vstupu patogenů (virů a bakterií)

- Snižuje incidenci

3. úroveň

Systémová ochrana

Vitamin D přispívá k normální funkci imunitního systému

Bactoral
Lactobacillus paracasei, L. CASEI 431®
Streptococcus salivarius K12 **IMUNO**



Poprvé zjištěn v ústní dutině dítěte odolného vůči infekcím krku profesorem Johnem Taggem

► Antibakteriální látky (salivarkiny A2 a B)

► Jen několik málo obyvatel má

K12 podobné kmeny *Streptococcus salivarius*

pouze 2%
přirozená ochrana



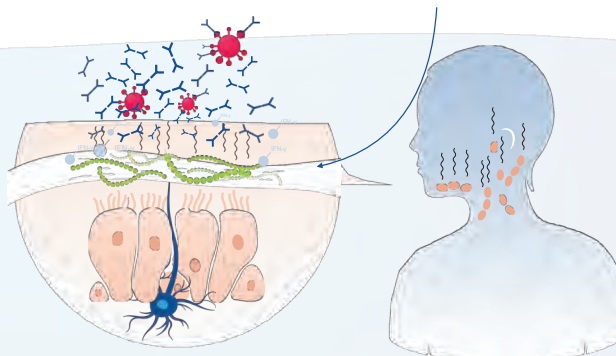
Bactoral
IMUNO

K12 – způsob účinku

Stimulace imunity: Zvýšení hladiny INF- γ (vrozená imunitní odpověď) a protilátek proti respiračním virům (adaptivní imunitní odpověď, zkřížená imunita)

Antivirová aktivita SSK12

- 1 Přilnavost k buňkám ústní sliznice
- 2 Tvorba ochranného biofilmu
- 3 Stimulace vrozené imunitní odpovědi (cytokiny, např. INF- γ)
- 4 Stimulace adaptivní imunitní odpovědi (specifické protilátky, např. sIgA)

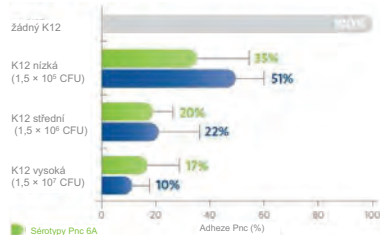


Hájek et al. 2007, Appl Environ Microbiol: 1 107-1 113

Bactoral
IMUNO

K12 inhibuje růst a adhezi *S. pneumoniae*

K12 snižuje adhezi pneumokoků k buňkám faryngeálního epitelu

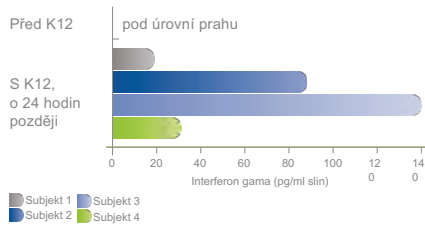


Manning et al. BMC Microbiology (2016) 16: 225

- **Přímá inhibice** pozorována u všech testovaných sérotypů, jako jsou 6A a 19F (včetně sérotypů 1/4/7F/14, které se běžně vyskytují u invazivních onemocnění)
- K12 vykazuje **na dávce závislou inhibici** adheze k epitelálnímu buňkám, ať už byla přidána před, současně, nebo po *S. pneumoniae*

Bactoral
IMUNO

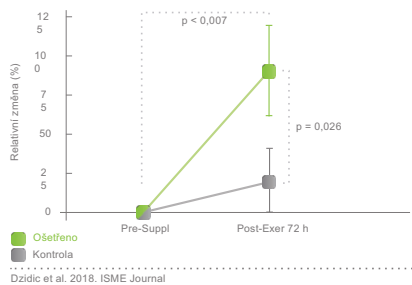
K12 stimuluje uvolňování INF- γ



Chilcott, C. N., et al. 2005. Joint New Zealand and Australian Microbiological Societies Annual Meeting

- Indukuje slinný INF- γ u zdravých osob po 24 hodinách
- Přímé protivirové mechanismy INF- γ byly prokázány v mnoha klinických hodnoceních

K12 stimuluje uvolňování protilátek v ústní dutině



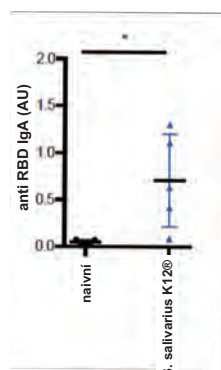
Dzidic et al. 2018. ISME Journal

Bertuccioli et al. 2023

- Salivární imunoglobulin A (sIgA) je hlavním imunitním faktorem ve slinách
- Nízké koncentrace sIgA jsou spojeny se zvýšenou incidencí RI
- Intenzivní trénink akutně koreluje se snížením imunitní odpovědi, včetně snížení koncentrace sIgA
- Souvisí to se zvýšenou náchylností k RI od 3 do 72 hodin po intenzivním cvičení

K12 zvyšuje hladinu a sekreci IgA ve slinách u zdravých osob, které podstupují vysoce intenzivní trénink

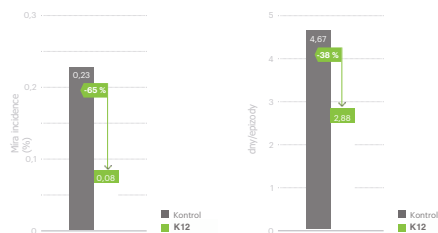
K12 stimuluje adaptivní imunitní odpověď v ústní dutině



Ninnemann et al. 2021

- K12 vyvolává zkříženě reaktivní protilátky proti RBD doméně hrotového proteinu SARS-CoV-2
- K12 stimuluje b-buňky k produkci IgA, který se váže na RBD (receptor binding domain) viru
- Pokud je tato doména blokována protilátkou (IgA), virus se již nemůže vázat na receptor ACE2, a tím jsou buňky chráněny před virovou infekcí

Snížení incidence respiračních infekcí u dospělých



Wang et al. 2021, Front Bioeng Biotechnol 9: 646184

favea+

Lékařské přínosy:

- Snížení incidence respiračních infekcí
- Kratší trvání epizod
- Méně dnů nemocenské
- Celkem 1 klinické hodnocení – 200 dospělých (lékařský personál pro pacienty s onemocněním COVID-19)
- 100 pacientů na skupinu (**Bactoblis**® = 100, kontrola = 100)
- **Design studie:** multicentrická, otevřená, randomizovaná, kontrolovaná studie
- **Dávkování:** 1 pastilka **Bactoblis**® po dobu 30 dní
- **Trvání:** 1 měsíc s terapií **Bactoblis**®

Bactoral
IMUNO



- Původně izolován ze vzorku stolice zdravého dítěte
- **Schopnost přežít v žaludeční kyselině**
- Používá se v potravinách a doplňcích stravy od roku 1995
- Více než 20 publikací v rámci klinických hodnocení u lidí

→ **L. CASEI 431®** je spojen se zvýšenou hladinou sérových protilátek

→ **Patentován pro imunitní odpověď**



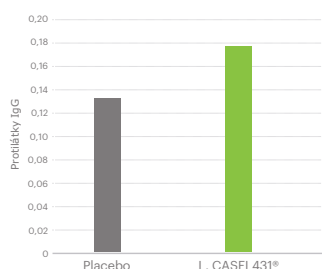
Hynek et al. 2007, Appl Environ Microbiol: 1 107–1 113

L. CASEI 431® logo™ je ochranná známka společnosti Chr. Hansen A/S

favea+

Bactoral
IMUNO

L. CASEI 431® stimuluje protilátky IgG



Rizzardi et al. 2012, British Journal of Nutrition 107, 876–884

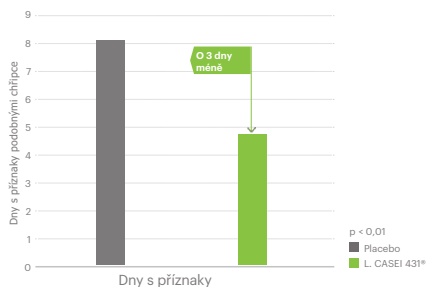
favea+

Lékařský přínos:

- **L. CASEI 431®** významně zvýšil sérové IgG
- **Typ studie:** randomizovaná, kontrolovaná studie imunitních účinků přípravku **L. CASEI 431®**
- **Trvání:** 6 týdnů s terapií **L. CASEI 431®**
IgG neboli imunoglobulin G je klíčovým efektem adaptivního imunitního systému

Bactoral
IMUNO

L. CASEI 431® zkracuje dobu trvání virových infekcí



Jespersen et al. 2015, Am J Clin Nutr 101:1 188

favea+
pro vaše zdraví

Lékařský přínos:

- ▶ L. CASEI 431® vede ke snížení počtu dní s respiračními infekcemi
- ▶ Celkem 1 klinické hodnocení = 1 104 zdravých osob (ve věku 18–60 let).
Druhá největší studie v historii!
- ▶ Typ studie: randomizovaná, kontrolovaná studie
- ▶ Trvání: 42 dní s terapií L. CASEI 431®
- ▶ Po 21 dnech očkování proti chřipce

Bactoral
IMUNO

favea+
pro vaše zdraví

Bactoral Imuno – prémiová ochrana během sezony nachlazení a chřipky

Unikátní kombinace probiotických kmenů K12 a L. CASEI®

Prémiová ochrana působící na dvě různé úrovně

Klinicky účinné dávkování po dobu expirační lhůty



Optimalizované mukoadhezivní vlastnosti a delší rozpad pro zajištění maximální kolonizace

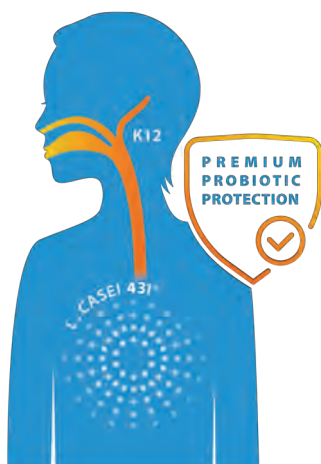
Nižší incidence virových infekcí dýchacích cest

Pozoruhodná stabilita

Výjimečné přijetí u dospělých

Bactoral
IMUNO

Bactoral Imuno – klinický souhrn



Lékařské přínosy:

- ▶ Stimulace orální imunity (slinné INF-y a sIgA)
- ▶ Stimulace systémové imunity (sérové IgG)
- ▶ Nižší incidence respiračních infekcí u dospělých
- ▶ Zkrácení doby trvání respiračních potíží

Bactoral
IMUNO

Kdy užívat Bactoral Imuno

- Ochrana před respiračními infekcemi během sezony nachlazení a chřipky
- Opakovaná incidence respiračních infekcí
- Vyšší riziko vzniku respiračních infekcí, například u:
 - sportovců
 - starších osob (např. aspirační pneumonie)
 - osob vystavených patogenům (např. při cestování)
 - osob zažívajících stres

favea +
pro vaše zdraví

Bactoral
IMUNO



Jak užívat Bactoral Imuno

Pastilka

- Jednou denně
- Po vyčištění zubů nechte pastilku pomalu rozpustit v ústech



Naše doporučení

- Preventivní nebo terapeutické užívání při opakovaných infekcích: 1 pastilka/sáček denně po dobu 30 dnů (1 měsíc)

Pro dosažení optimálních výsledků doporučujeme tříměsíční užívání

První prokazatelné výsledky po 10 dnech

Dlouhodobé výsledky, pokud užíváte Bactoral Imuno každý den pro udržení účinku

„Mějte své zdraví pod kontrolou díky jedné pastilce Bactoral denně“

favea +
pro vaše zdraví

Bactoral
IMUNO

Řešení pro všechny

Věk
1



Věk
3



Věk
18



Bactoral
IMUNO

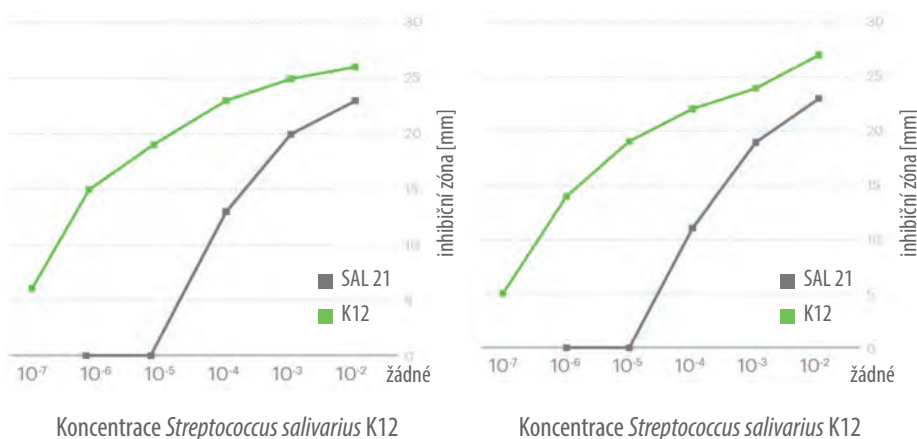
ORIGINÁL JE JEN 1

BACTORAL – *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* K12

ENUMERACE A INHIBIČNÍ AKTIVITA podobných kmenů z komerčních produktů

Bactoral porovnáváme s komerčním produktem, který obsahuje *Streptococcus salivarius* SAL 21, ale koncentrace buněk tvořících kolonie (CFU) (viabilních) je výrazně nižší než obsah uváděný na komerčním obalu (2×10^9 CFU) a 1 000krát nižší než u přípravku Bactoblis® (Bactoral®). Přípravek byl testován v květnu, datum spotřeby bylo v listopadu 2022. Kromě toho je minimální inhibiční koncentrace (MIC), indikátor antibakteriální aktivity zásadní pro klinickou účinnost, 1 000krát vyšší než u přípravku Bactoblis® (Bactoral®), což by pravděpodobně vedlo k výrazně nižší klinické účinnosti. Vodní aktivita (Aw), indikátor stability, je výrazně vyšší ve srovnání s přípravkem Bactoblis® (Bactoral®), což svědčí pro nízkou stabilitu během skladovatelnosti. Tato nízká stabilita je potvrzena změnou barvy pozorovanou 6 měsíců před datem spotřeby.

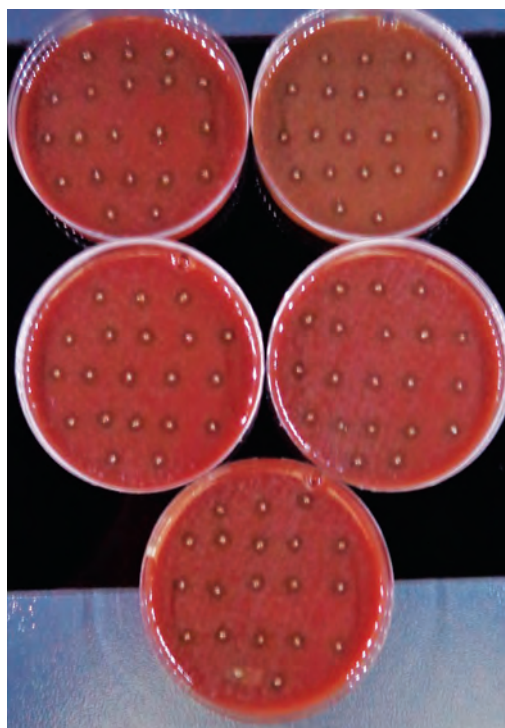
Průměry inhibičních zón proti indikátorovým kmenům I1 a I2 (= antibakteriální aktivita)



Celkově výsledky naznačují velmi nízkou kvalitu produktu SAL 21, což svědčí pro žádnou nebo velmi nízkou aktivitu proti klíčovým patogenům způsobujícím infekce horních cest dýchacích.

	Klíčové specifikace produktu definující účinnost	
	Bactoblis® (Bactoral®)	SAL 21
Aw	0,121	0,404
CFU	$4,11 \times 10^9$	$3,98 \times 10^6$
MIC	10^{-7}	10^{-4}

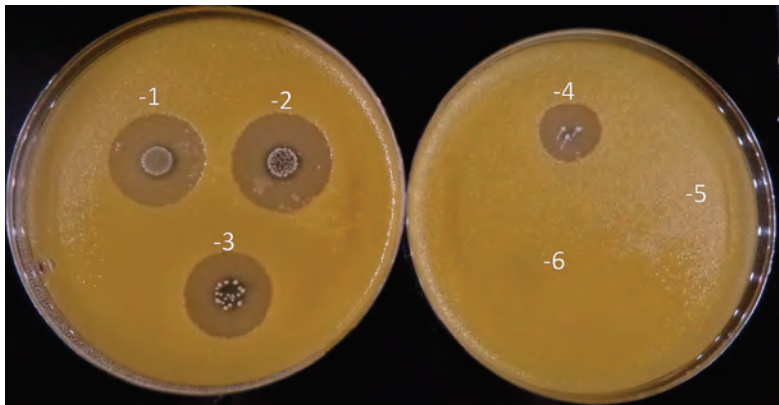
Pozorovaná změna barvy přípravku s obsahem *Streptococcus salivarius* SAL 21 svědčí pro nízkou stabilitu



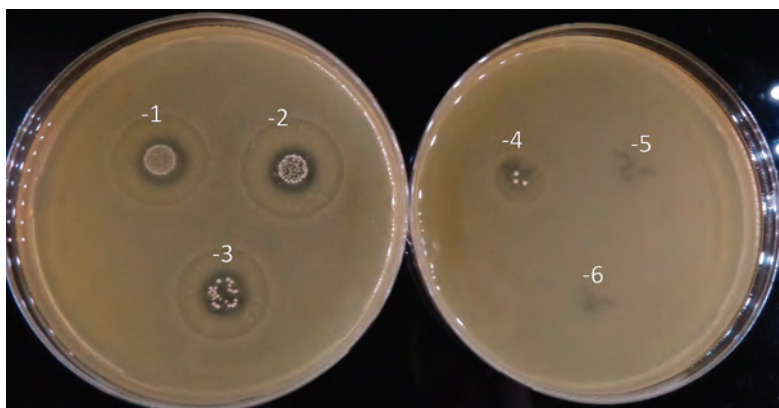
Inhibice I1 (vlevo) a I3 (vpravo) probiotickým kmenem z komerčního produktu

Stanovení MIC

MIC tohoto produktu byla 10^{-4} proti I1 i I2, což znamená, že nejnižší ředění pořád vykazující jasnou inhibici bylo 10^{-4} . Průměry inhibičních zón pro každé ředění a každý indikátorový kmen jsou uvedeny v tabulce.



↑ SAL 21 indikátor I1



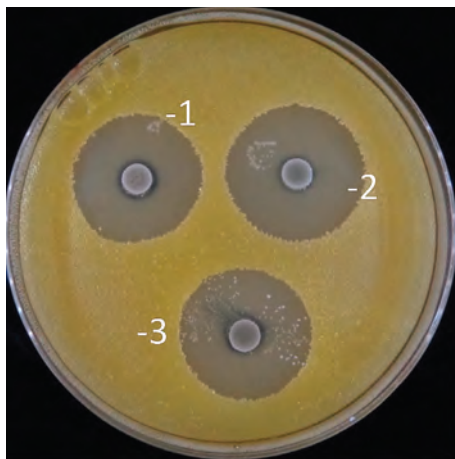
↑ SAL 21 indikátor I2

MIC přípravku se SAL 21 (šedá) a průměry inhibičních zón proti indikátorovým kmenům I1 a I2

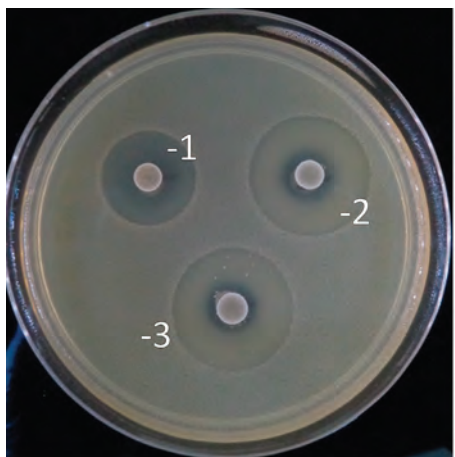
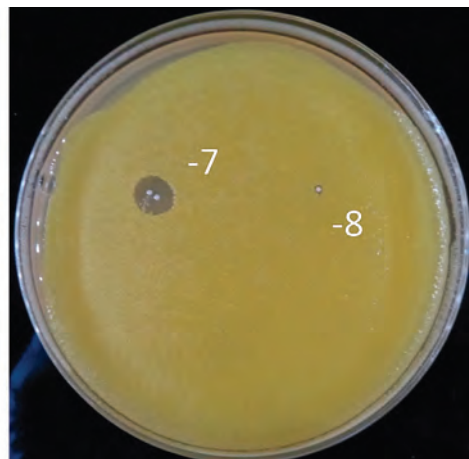
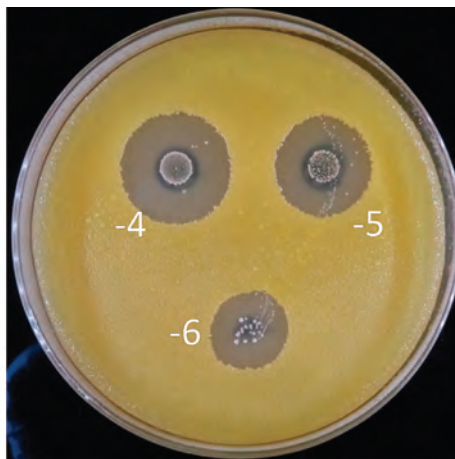
Ředění	Průměr inhibiční zóny [mm]	
	I1	I2
10^{-1}	21	21
10^{-2}	23	23
10^{-3}	20	19
10^{-4}	13	11
10^{-5}	0	0
10^{-6}	0	0

MIC přípravku Bactoral (šedá) a průměry inhibičních zón proti indikátorovým kmenům I1 a I2

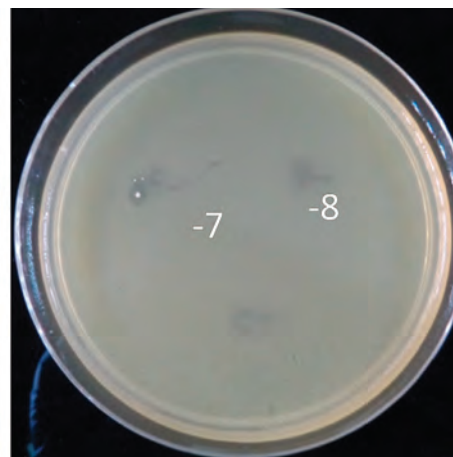
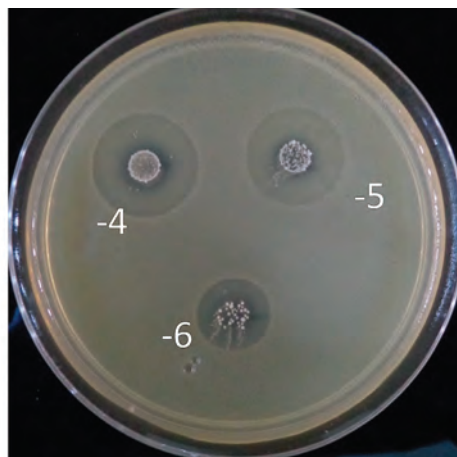
Ředění	Průměr inhibiční zóny [mm]	
	I1	I2
10^{-1}	21	21
10^{-2}	26	27
10^{-3}	25	24
10^{-4}	23	22
10^{-5}	19	19
10^{-6}	15	14
10^{-7}	6	5



↑ Bactoral indikátor I1



↑ Bactoral indikátor I2



***STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* K12**

A

STOMATOLOGICKÁ PRAXE



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 mikrobiy 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.

Výsledky: 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 podírají 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 nejnekladnějším 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. Nejužitečnější 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 antagonistického 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 inkubovány 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 inkubovány, 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

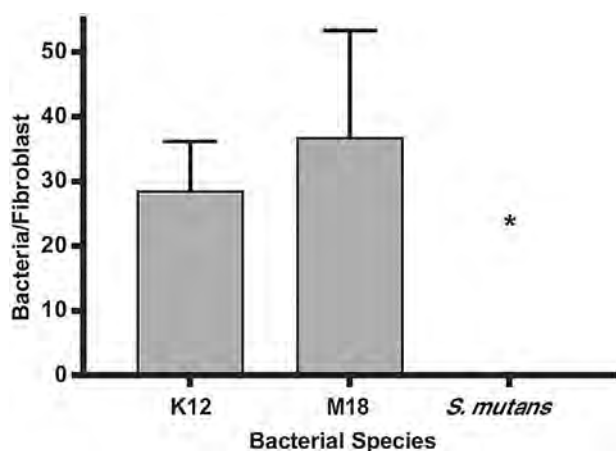
Kmen	Patogen			
<i>S. salivarius</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>S. mutans</i>
K12 [†]	++ [§]	++	+	— [¶]
M18 [*]	++	++	+	—

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

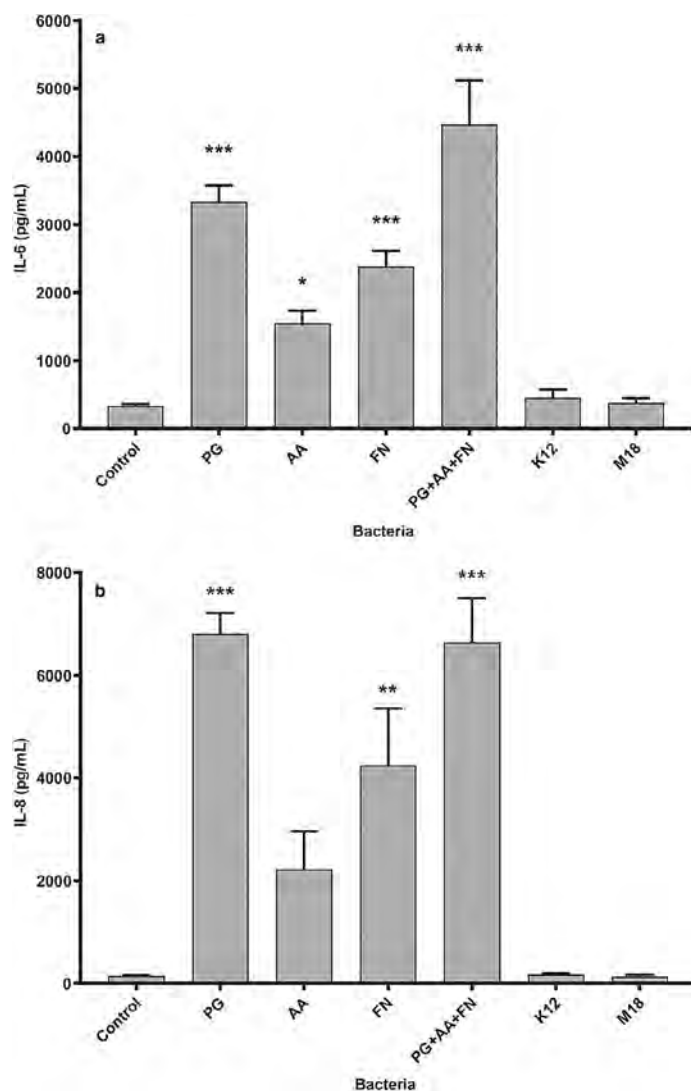
[†] *S. salivarius* K12; [§] *S. salivarius* M18; [§] (++) mírná precipitace s rovnoměrně zakaleným supernatantem a známkami flokulace; [¶] (—) bez koagregace, rovnoměrně zakalená suspenze

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 $\pm$



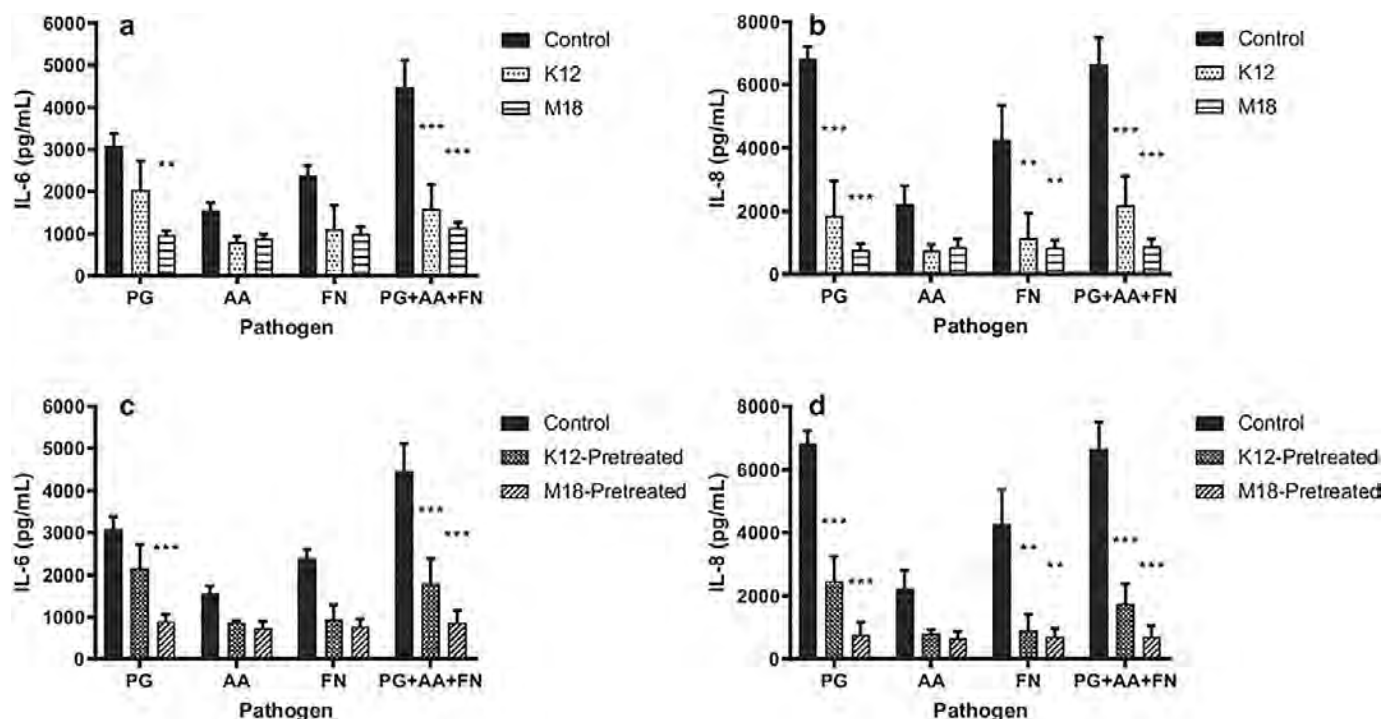
Obr. 2: Stimulace produkce cytokinů z lidských gingiválních fibroblastů. Uvolňování IL-6 (a) a IL-8 (b) primárními lidskými gingiválními fibroblasty indukované 8hodinovou koinkubací s *P. gingivalis* (PG); *A. actinomycetemcomitans* (AA); *F. nucleatum* (FN); *S. salivarius* K12 (K12); nebo *S. salivarius* 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 nezvýšila 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 nezvýšil 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

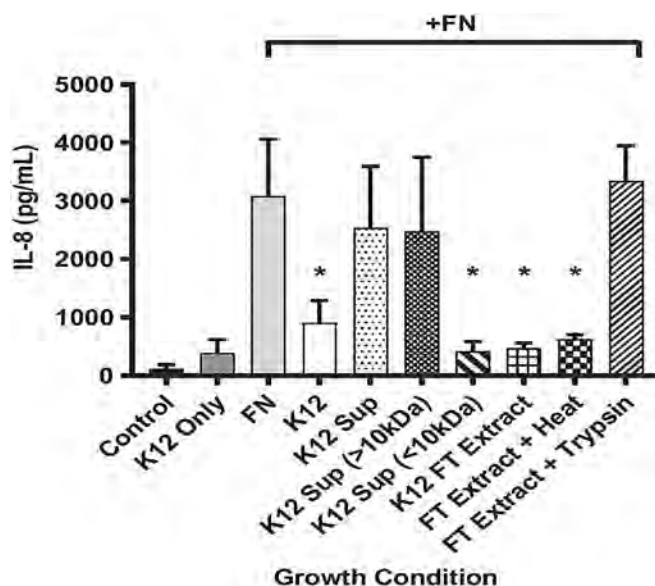
Předtím bylo zjištěno, že *S. salivarius* K12 ani M18 nejsou schopny přímo ani nepřímo (odložený antagonismus) inhibovat růst patogenu, a proto musí existovat jiný mechanismus účinku, který vysvětluje snížení odpovědi IL-6 a IL-8 gingiválních fibroblastů vyvolané těmito patogeny. Se zaměřením na uvolňování 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 indukcii *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 odebírány na začátku, po 4 hodinách, 24 hodinách, 7 dnech a 14 dnech.

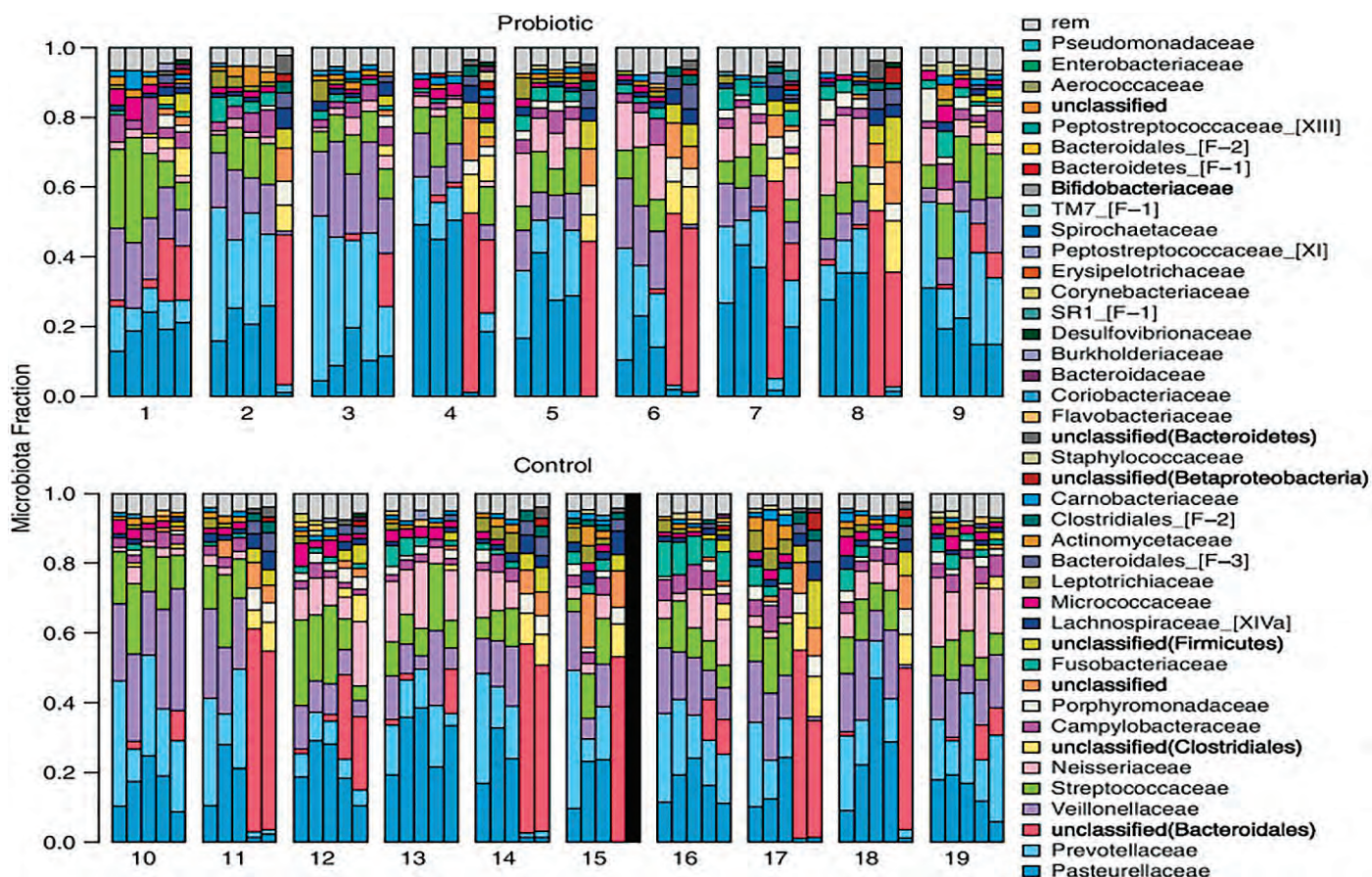
Vzorky slin byly podrobeny sekvenování genu 16S rRNA pomocí platformy Illumina



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 žvýkáci tablety obsahující buď *S. salivarius* K12 (horní panel) nebo neprobiotickou kontrolní žvýkačku (spodní panel). Každý shluk pruhů je jeden dobrovolník identifikovaný identifikačním číslem subjektu a každý pruh ve shluku 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 nejnížší 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 diferenciace 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

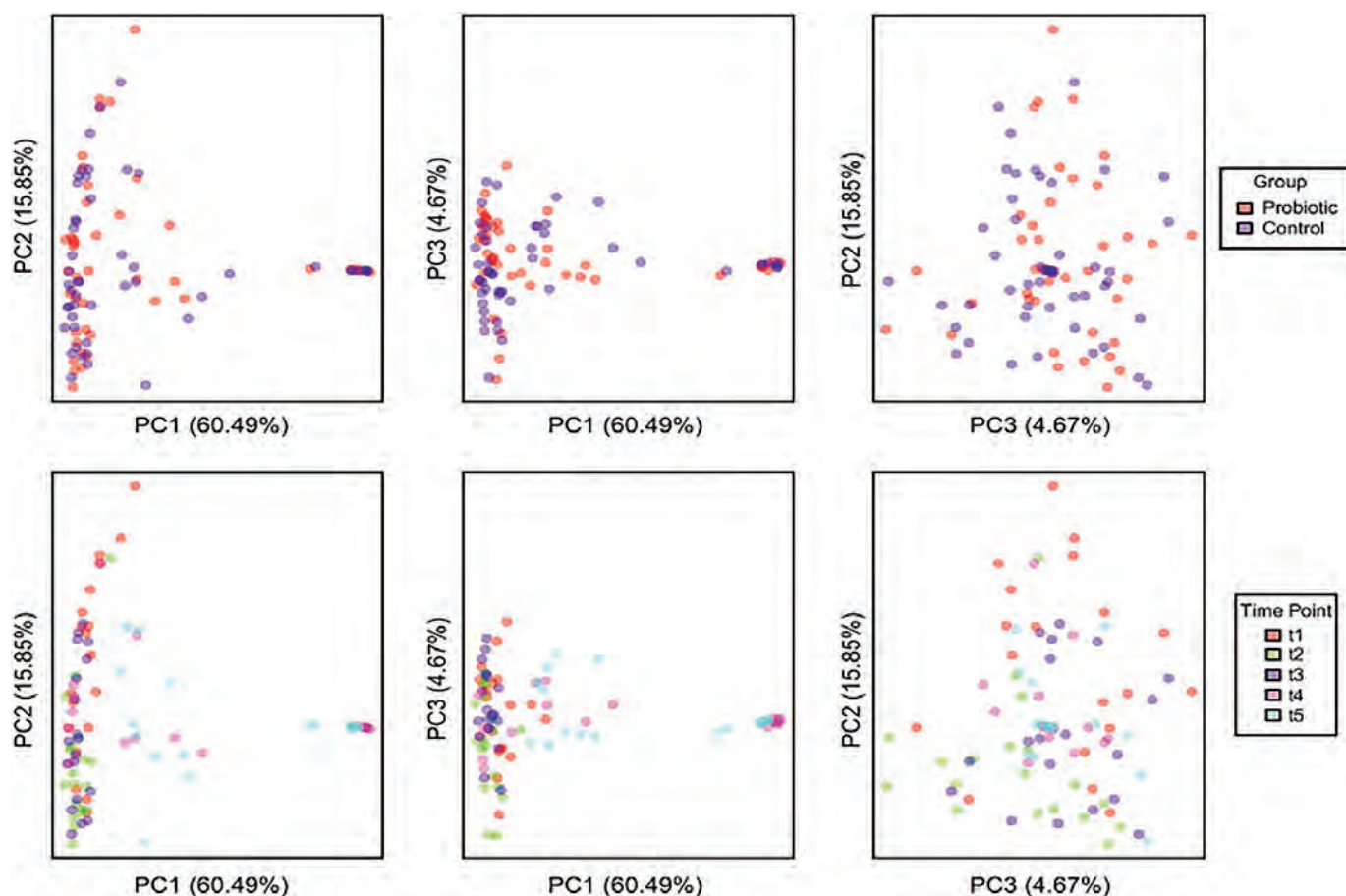
účinku $\geq 1,5$). Zkoumání OTU ve skupinách podle čeledí pomocí algoritmu BLAST oproti HOMDB ukázalo, že většina sekvencí OTU v *Erysipelotrichaceae* byla podobná (> 80 % sekvenční identity) *Erysipelothrix tonsillarum* (HOT_484) nebo *Solobacterium moorei* (HOT_678).

Změny hladin prozánětlivých cytokinů

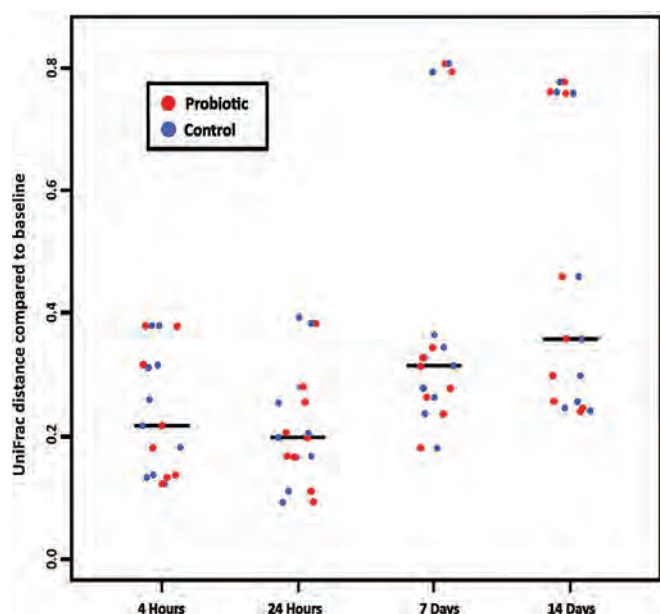
V odebraných slinách devíti osob ve skupině s probiotickými žvýkačkami byly v každém časovém bodě měřeny koncentrace čtyř prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-8 a TNF- α), které souvisejí s onemocněním parodontu. Jednalo se o zdravé jedince bez zjevného onemocnění dutiny ústní, nicméně každý z 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 rozdílů 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 adherovat 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 epitelální 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.

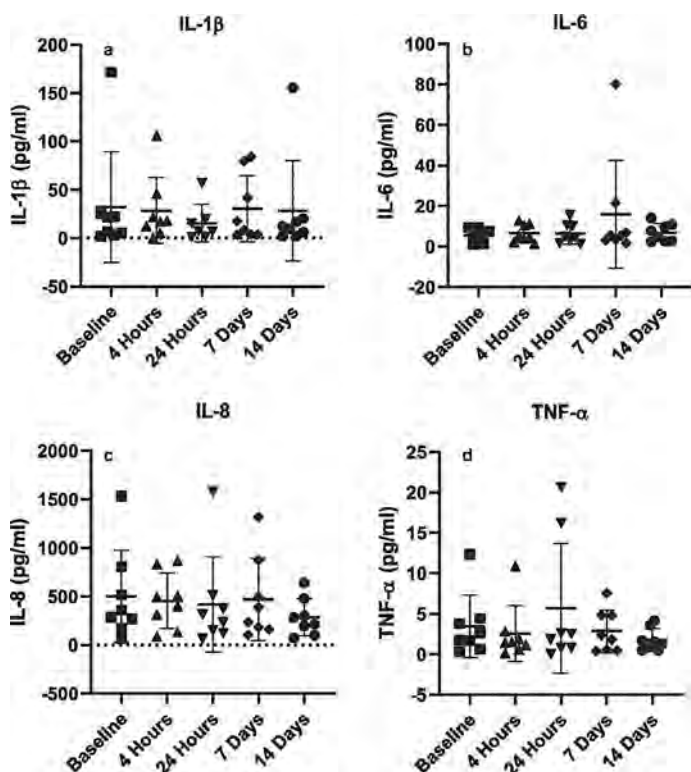
Mnoho druhů streptokoků má prokázané protizánětlivé vlastnosti. Tato studie prokázala, že jak *S. salivarius* K12, tak M18 nebyly schopny vyvolat odpověď IL-6 nebo IL-8 u primárních lidských gingiválních fibroblastů, přestože byly schopny dobře adherovat k této tkáni. Oba kmeny navíc dokázaly inhibovat 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 nezvýšil 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 pufrovaný fyziologický roztok); PCoA: Principal component analysis (analýza hlavních komponent).

Poděkování: *S. salivarius* K12 a M18, *C. albicans* TIMM 1768 a devět standardních indikátorových kmenů (11 až 19) bylo laskavě poskytnuto z laboratorní sbírky dr. J. R. Tagga (University of Otago, Dunedin, Nový Zéland). Děkuje společnosti Prairies Natural za dodání probiotických živých kmenů 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 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 10641) 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, Faller 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;19(4):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–450S.
- Teughels W, Durukan A, Ozelik O, Pauwels M, Quirynen M, Haytac 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 lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2006;90(3):269–80.
- Hyink O, Wescombe PA, Upton M, Ragland N, Burton JP, Tagg JR. Salivaricin A2 and the novel lantibiotic salivaricin 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. Antiinflammatory 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- κ B 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, Chikamara 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.
- Siepen I, Van Damme J, Van Esche 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, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009;9:259.
- Yang F, Zeng 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.

ZÁKLADEM NAŠEHO IMUNITNÍHO SYSTÉMU JSOU DOBŘE FUNGUJÍCÍ STŘEVA



*Právě tady se nachází až 85 % našich imunitních buněk.
Jen zdravá a správnými mikroorganismy osídlená
sliznice lidského střeva může odolat infekcím.*

Probiolact forte N°12 je výsledkem několikaletého výzkumu české biotechnologické společnosti, který přináší revoluci na trhu s probiotiky. V brněnských laboratořích se podařilo připravit **přátelská probiotika** novým, **vědecky zcela převratným způsobem**. Současné probiotické preparáty obsahují přátelské bakterie ve formě volných buněk. Na střevní sliznici, kde probiotika působí, je nutné, aby tyto bakterie vytvořily **ochrannou a podpůrnou vrstvu** tzv. **biofilm**.

Probiolact forte N°12 jako **jediné přípravky** na trhu obsahují přátelské bakterie ve formě této ochranné a stimulační vrstvy – **biofilmu**.

Probiolact forte N°12 je vhodný **při užívání antibiotik**, **při cestování** a díky vitamínu C a D i k podpoře správné funkce **imunity a metabolismu**.

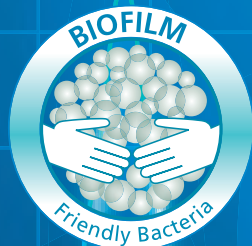
Probiolact forte N°12 obsahuje 12 resp. 14 probiotických kmenů v počtu 10 miliard v jedné tobolce.

BUTYRATE INFUSION DOPLŇEK STRAVY

**ČISTÁ OPTIMALIZOVANÁ FORMA BUTYRÁTU
V ENTEROSOLVENTNÍ ÚPRAVĚ!**

Doplňek stravy **Butyrate Infusion** je určený pro doplnění butyrátu. Butyrát představuje elementární krátkořetězovou mastnou kyselinu (SCFA).

Je produkován zejména bakteriemi fermentujícími vlákninu ve střevě a jeho množství může být sníženo při nerovnovážné střevní mikroflóře. Butyrát slouží jako **zdroj energie pro enterocyty**, buňky které tvoří střevní výstelku. Enterosolventní úprava chrání butyrát před nízkým pH v žaludku a zajišťuje jeho dopravení do střeva.



favea+
pro vaše zdraví

INHIBIČNÍ ÚČINKY *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* K12 NA TVORBU KARIOGENNÍHO BIOFILMU

Hyun-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 znásobné sériové ředění do 11. sloupce. *S. mutans* byly spočítány 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 mikrodestičkovém 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 *Mitisalivarius* a na agarovou destičku *Mitisalivarius* 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 skličku 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.

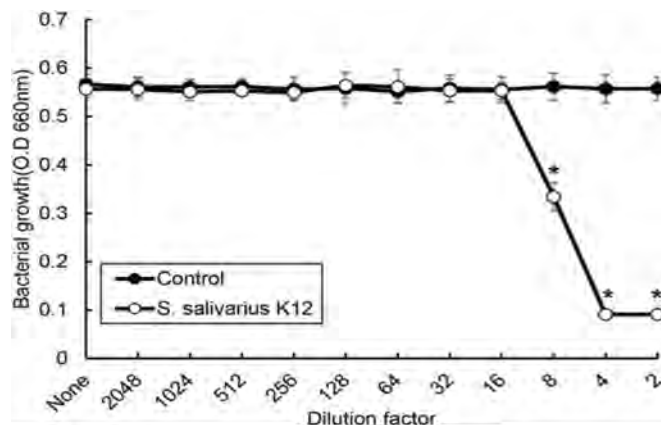
Zkoumání podílu bakterií v biofilmu

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 $7\,000 \times g$ 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: antimikrobiální 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 U SuperScript™ 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

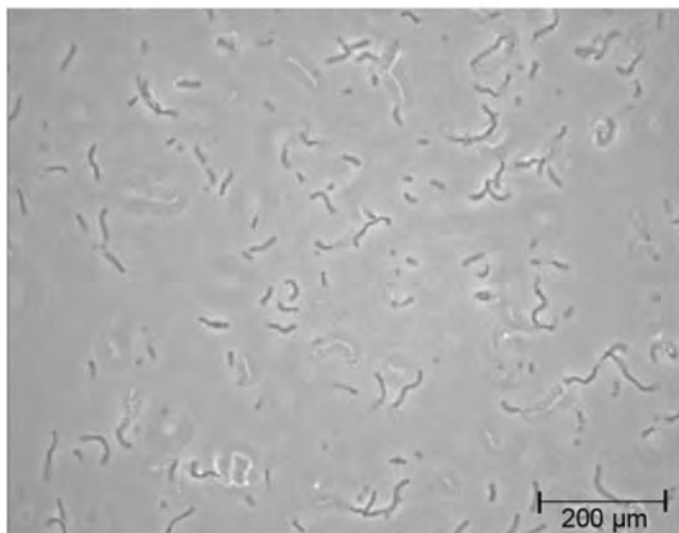
Rozložení dat bylo zkoumáno pomocí Kolmogorov–Smirnovova testu. Významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly analyzovány pomocí Kruskal–Wallisova testu a Mann–Whitneyho U testu s použitím IBM SPSS statistics Ver. 23 (IBM, Armonk, NY, USA). Hodnoty P menší než 0,05 byly považovány za statisticky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

Výsledky

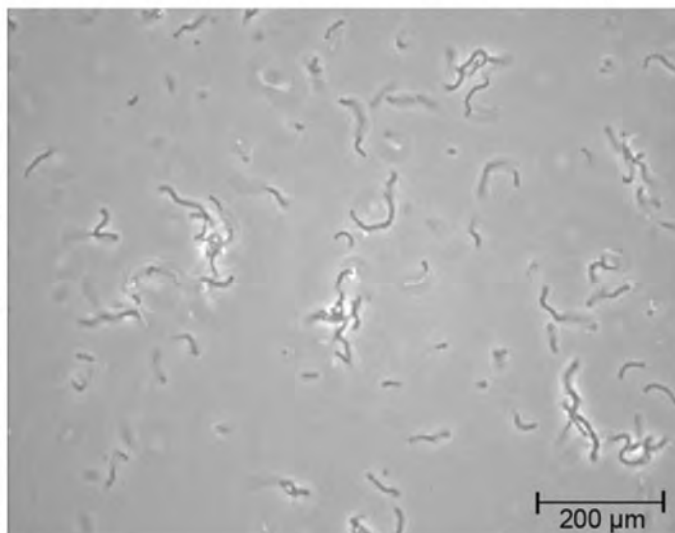
Antibakteriální aktivita *S. salivarius* K12 proti *S. mutans*

V antimikrobiálním experimentu s použitím SCM *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

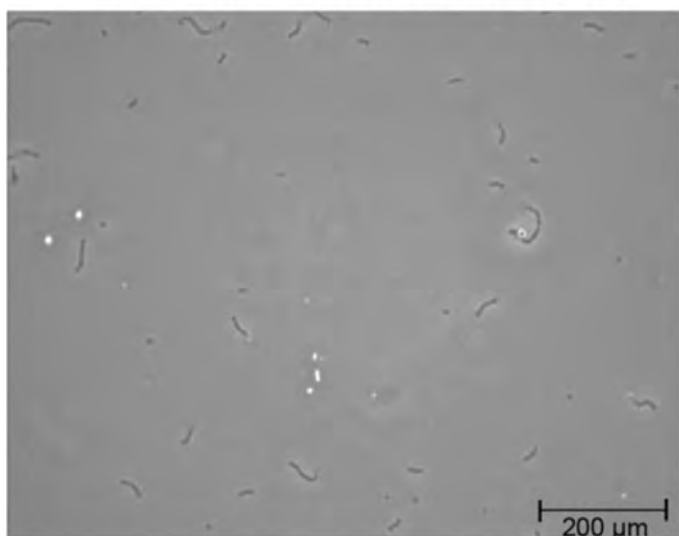
A. *S. mutans*



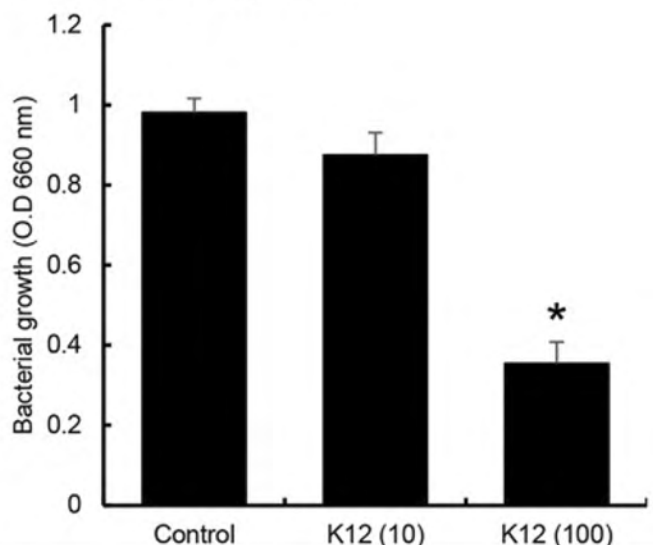
B. *S. mutans*+*S. salivarius* K12(10)



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).

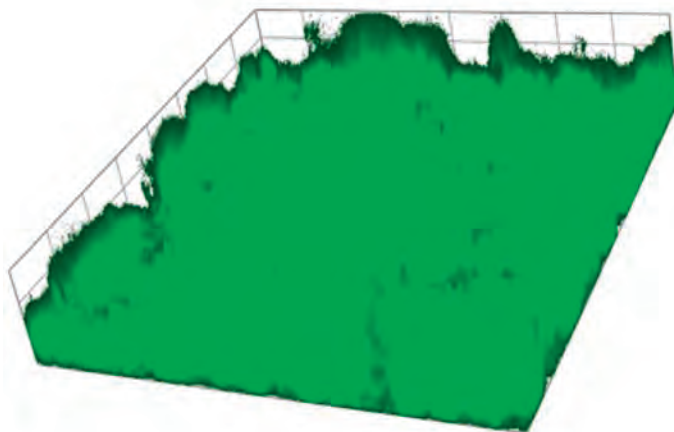
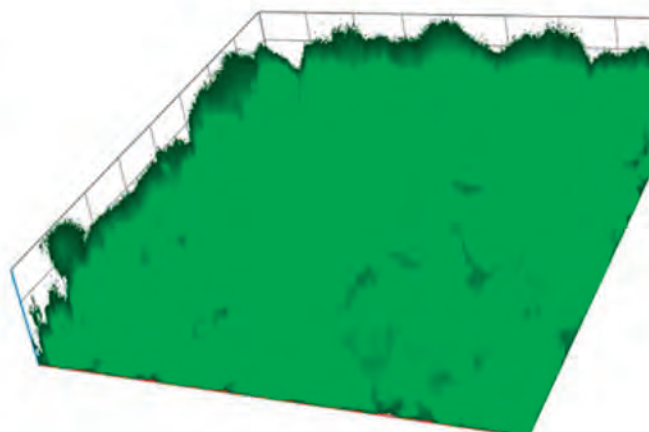
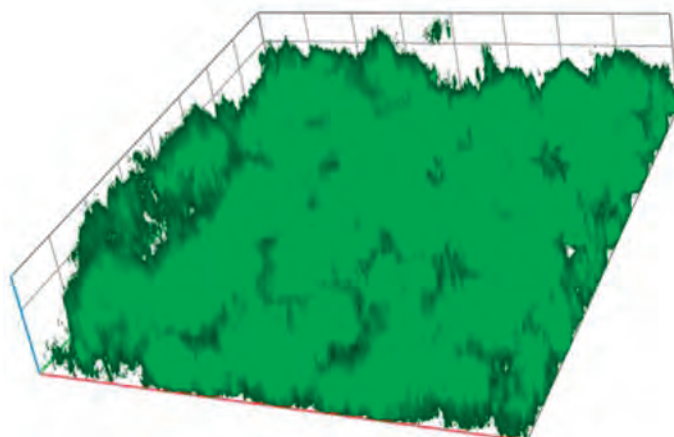
Inhibice tvorby kariogenního biofilmu

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).

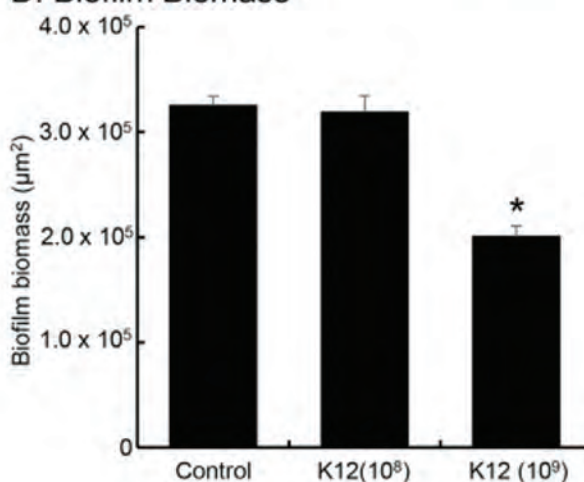
Podíl bakterií v biofilmu

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).

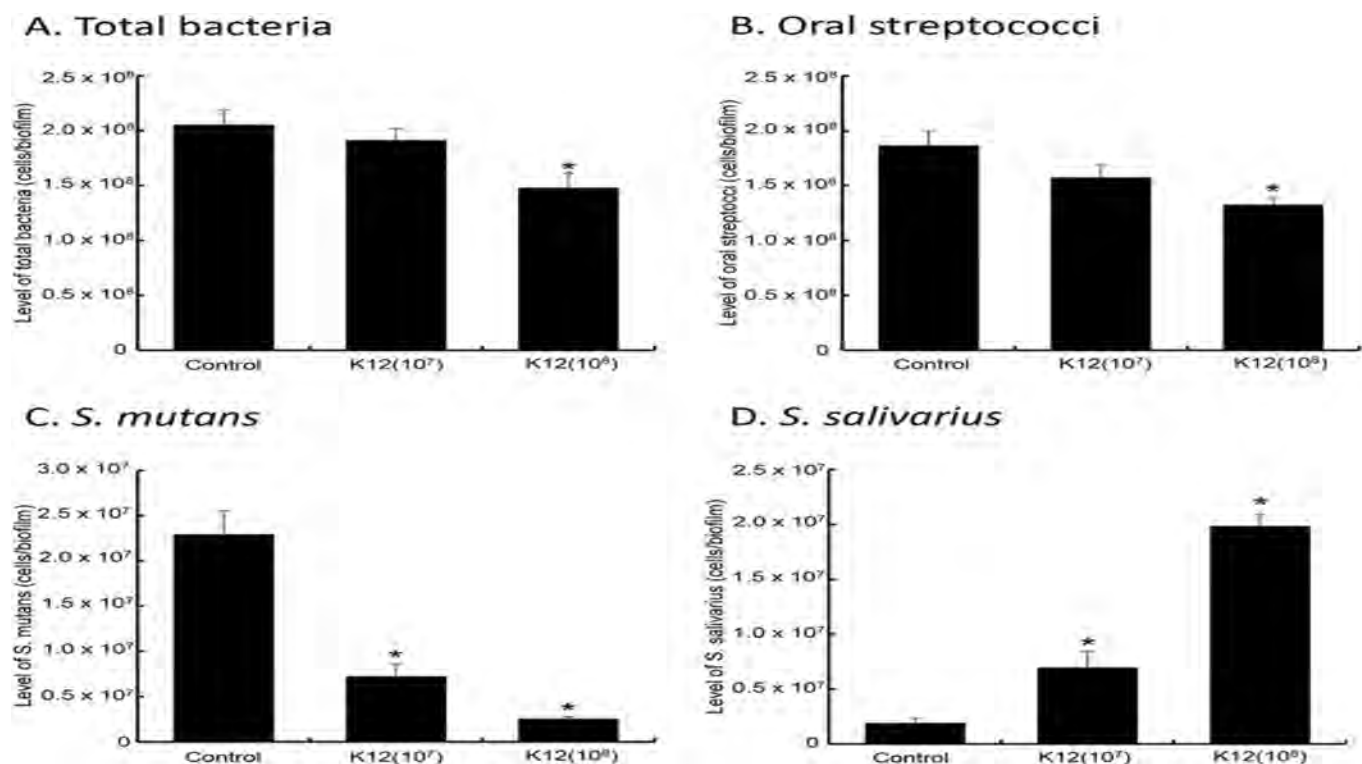
Diskuse

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

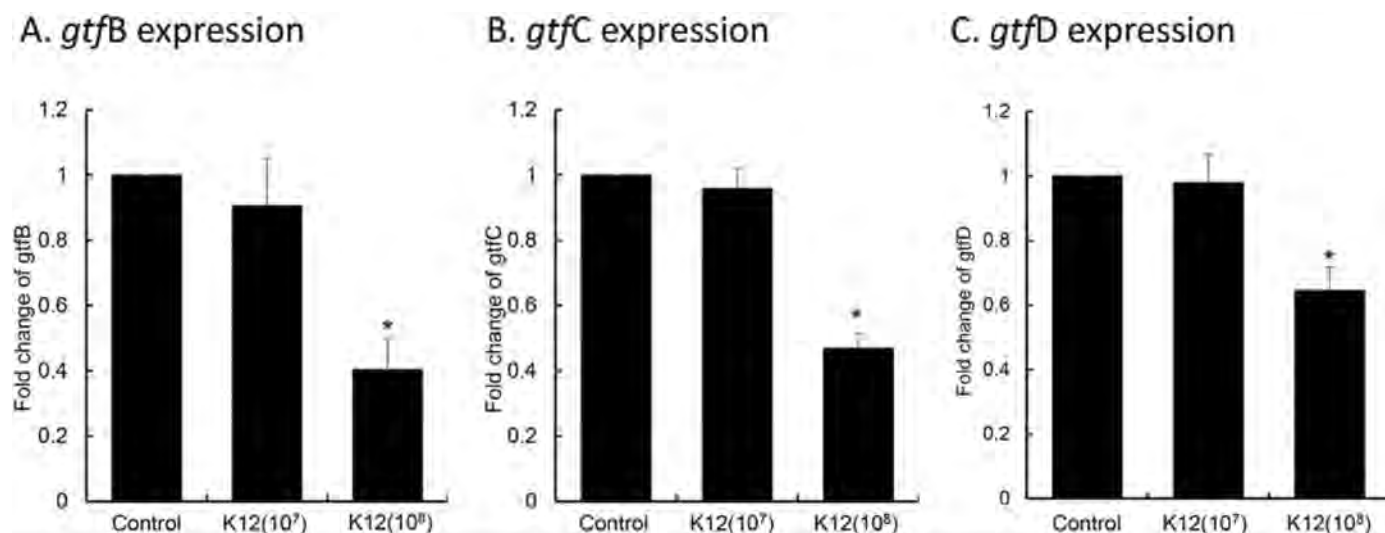
antimikrobiální aktivitu proti různým bakteriím a plísním.^{20,21} Cílem této studie bylo zjistit vliv *S. salivarius* K12 na kariogenní biofilm a jeho mechanismus inhibice tvorby kariogenního biofilmu.

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 kultivaci *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



Obr. 4: podíl bakterií v biofilmu. Při tvorbě biofilmu 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 biofilmu 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 biofilmu. Při tvorbě biofilmu 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 gtfD (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.

(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 10⁷ a 10⁸ 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 10⁷ a 10⁸ 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*. Závěrem lze říci, že *S. salivarius* K12 inhiboval tvorbu kariogenního biofilmu a rovněž růst *S. mutans* v biofilmu. 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 zájmu: 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

1. Lemme A, Sztajer H, Wagner-Dobler I. Characterization of mleR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol* 2010;10:58.
2. Kreh J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:213e9.
3. 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.
4. 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.
5. Marsh PD, Head DA, Devine DA. Dental plaque as a biofilm and a microbial community-Implications for treatment. *J Oral Biosci* 2015;57:185e91.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Meurman JH, Stamatova I. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis* 2007;13:443e51.
10. Barbour A, Wescombe P, Smith L. Evolution of lantibiotic salivarinins: new weapons to fight infectious diseases. *Trends Microbiol* 2020;28:578e93.
11. 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.
12. Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T, Hamada S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyl-transferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *J Dent Res* 2002;81:109e13.
13. Takle GW, Toth IK, Brurberg MB. Evaluation of reference genes for real-time RT-PCR expression studies in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC Plant Biol* 2007;7:50.
14. Kovachev SM, Vatcheva-Dobrevska RS. Local probiotic therapy for vaginal *Candida albicans* infections. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2015;7:38e44.
15. Scaldaferrì 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.
16. Guarino A, Guandalini S, Lo Vecchio A. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2015;49: S37e45.
17. 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.
18. 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.
19. Hyink O, Wescombe PA, Upton M, Ragland N, Burton JP, Tagg JR. Salivaricin A2 and the novel lantibiotic salivaricin 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.
20. Zupancic K, Kriksic V, Kovacevic I, Kovacevic D. Influence of oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on ear and oral cavity health in humans: systematic review. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2017;9:102e10.
21. 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.
22. Kim YJ, Lee SH. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* HY 449 on cariogenic biofilm. *J Microbiol Biotechnol* 2016;26: 1829e35.
23. Castillo A, Rubiano S, Gutierrez J, Hermoso A, Liebana J. Post-pH effect in oral streptococci. *Clin Microbiol Infect* 2000;6: 142e6.
24. Wescombe PA, Dyet KH, Dierksen KP, et al. Salivaricin G32, a homolog of the prototype *Streptococcus pyogenes* nisin-like lantibiotic SA-FF22, Produced by the commensal species *Streptococcus salivarius*. *Internet J Microbiol* 2012;2012: 738503.
25. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003;69:722e4.
26. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8:263e71.
27. 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.

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

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



30

tablet rozpustných v ústech
tableti rozpustných v ústech



ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNÁ MIKROBIOTA

PROTIZÁNĚTLIVÁ ÚČINNOST *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* LIDSKÉHO PŮVODU NA ZÁNĚT VYVOLANÝ PARODONTOPATOGENY

Dong-Heon Baek a Sung-Hoon Lee

Department of Dental Hygiene, College of Health Science, Dankook University, Cheonan 31116, Korejská republika

Abstrakt

Streptococcus salivarius je prospěšnou bakterií v ústní dutině a některé kmeny této bakterie jsou známy jako probiotika. Cílem této studie bylo prozkoumat protizánětlivý účinek a mechanismus působení lipoteichoové kyseliny (LTA) *S. salivarius* G7 na lipopolysacharid (LPS) a LTA parodontopatogenů. Povrchové molekuly *S. salivarius* G7 byly extrahovány a samostatně nebo společně ošetřeny na lidských monocytárních buňkách LPS a LTA parodontopatogenů. Indukce exprese cytokinů byla hodnocena pomocí PCR v reálném čase a ELISA. Po fluorescenčním značení LPS a LTA parodontopatogenů byla na buňky aplikována jejich kombinace s LTA *S. sa-*

livarius. Vázané LPS a LTA byly měřeny průtokovým cytometrem. Byla také provedena analýza vazby LPS a LTA na CD14 a LPS vazebný protein (LBP). Povrchové molekuly *S. salivarius* G7 neindukovaly expresi zánětlivých cytokinů a LTA *S. salivarius* G7 inhibovala zánětlivé cytokiny indukované LPS a LTA parodontopatogenů. LTA *S. salivarius* G7 inhibovala vazbu svých LPS a LTA na buňky. LTA *S. salivarius* G7 také blokovala vazbu svých LPS a LTA na CD14 a LBP. *S. salivarius* G7 má inhibiční účinek na zánět vyvolaný LPS nebo LTA parodontopatogenů a může být kandidátem na probiotikum pro prevenci parodontitidy.

Úvod

Hlavní onemocnění dutiny ústní související s bakteriemi lze obecně rozdělit na onemocnění zubů a dásní. Periodontitida, jedno z onemocnění dásní, iniciuje imunitní odpověď hostitele na virulenci faktory gramnegativních anaerobů v dutině ústní [1]. Z gramnegativních anaerobů byly *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) a *Treponema denticola* (*T. denticola*) zařazeny skupinou Socransky do červeného komplexu, protože podle epidemiologického vyšetření byly často detekovány u pacientů s parodontitidou [2]. Také *Filifactor alocis* (*F. alocis*) se v poslední době objevuje jako důležitá bakterie související s parodontitidou, protože tato bakterie je detekována v oblastech endodontických a parodontálních zánětů [3, 4]. Na rozdíl od jiných parodontopatogenů je *F. alocis* grampozitivní mikrob a má virulentní faktor v podobě kyseliny lipoteichoové (LTA) [5].

Streptococcus salivarius (*S. salivarius*) je časný kolonizátor, který osidluje ústní dutinu člověka od novorozence a zůstává dominantním členem komenzální mikrobioty po celý život [6, 7]. V poslední době je *S. salivarius* zařazen do seznamu mikrobiálních potravinářských kultur s průkazem bezpečnosti ve fermentovaných potravinách podle Mezinárodní mlékárenské federace [8]. Mnoho kmenů produkuje bakteriocinům podobné inhibiční látky (BLIS), které hrají důležitou roli jak při stabilizaci ústní mikroflóry, tak při prevenci přemnožení různých patogenů s infekčním onemocněním v ústní dutině [9]. Antibakteriální aktivita byla pomocí BLIS zkoumána na mnoha kmenech *S. salivarius* a většina *S. salivarius* vykazovala antibakteriální aktivitu proti parodontopatogenům [10–12]. Také u izolovaného kmene K12 byla prokázána neutralizace halitózy a inhibice tvorby biofilmu [10, 13]. Díky těmto vlastnostem je snaha vyvinout *S. salivarius* jako probiotika, která udržují ústní dutinu zdravou, a mnoho studií prokázalo výsledky bezpečnosti a antibakteriální aktivity izolovaného *S. salivarius* [13–16].

Účinky *S. salivarius* na parodontitidu byly prezentovány jako výsledek jeho antibakteriální aktivity proti příbuzným bakteriím a existujícím studiím o biofilmu. Z mnoha studií o *S. salivarius* je však studie o mechanismu inhibice *S. salivarius* při indukcii zánětu lipopolysacharidem (LPS) parodontopatogenů málo známá. Cílem této studie bylo zjistit inhibiční účinek LTA *S. salivarius* G7 na zánětlivé cytokiny indukované LPS nebo LTA parodontopatogenů a analyzovat mechanismus jejich protizánětlivého působení.

Materiály a metody

Bakteriální druhy a podmínky kultivace

V této studii byl použit izolovaný kmen *Streptococcus salivarius* G7 (dříve KCOM 2137) z lidské ústní dutiny, který byl darován společností Greenstore Co. (Korea). Jako srovnávací kmen byl použit *S. salivarius* ATCC 7073. Bakterie *S. salivarius* byly kultivovány a udržovány v tryptikázovém sójovém bujonu (BD Biosciences, USA) doplněném 0,5 % glukózy (TSBG). Patogen *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

byl kultivován v infuzi mozkové a srdeční tkáně (BD Biosciences) doplněné heminem (1 µg/ml) a vitamínem K (0,2 µg/ml) a *Tannerella forsythia* ATCC 43037 byl kultivován v modifikovaném novém médiu pro orální spirochety [17]. Nakonec byl kultivován *Filifactor alocis* ATCC 35896 s použitím média columbia (BD Biosciences), L-cysteinu-HCl (2 g/l), L-argininu-HCl (4 g/l) a kvasničného extraktu (5 g/l), heminu (1 µg/ml) a vitamínu K (0,2 µg/ml). Parodontopatogeny byly udržovány v anaerobní komoře (85 % N₂, 10 % CO₂ a 5 % H₂).

Příprava povrchových proteinů z bakterií

Za účelem zkoumání vlivu povrchových proteinů bakterií na indukcii exprese cytokinů v buňkách THP-1 byly *S. salivarius* kultivovány v TSBG a sklizeny centrifugací při 4 000× g po dobu 5 minut při 4 °C. Bakterie byly třikrát promyty studeným fosfátovým pufrům (PBS, pH 7,2) a resuspendovány v 1 ml 8 M (Tris-pufr) močoviny obsahující 5 mM ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA) [18]. Po 30minutové inkubaci při pokojové teplotě s třepáním pomocí rotátoru (IKA Co., Německo) byl supernatant centrifugován při 11 000× g po dobu 6 minut, aby se zachytily solubilní proteiny. Roztok obsahující solubilní proteiny byl filtrován 0,45µm polyvinylidenfluoridovým (PVDF) filtrem (Millipore, USA). Roztok byl přenesen do standardní RC dialyzační membránové hadičky (Spectrum Laboratories Inc., USA) a hadička byla dialyzována ve studeném PBS (pH 7,2) k odstranění močoviny. Proteiny byly měřeny pomocí soupravy Bradford assay (Bio-Rad Lab., USA).

Příprava LTA a LPS

LTA byla extrahována ze *S. salivarius* a *F. alocis* podle metody popsané autory Yoo a Lee [5]. Bakterie byly shromažďovány centrifugací při 7 000× g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C a třikrát promyty 0,1 M citranem sodným pufrům (pH 4,5) a následně resuspendovány v 0,1 M citranem sodným pufrům. Suspenze byla ošetřována lysozymem (100 µg/ml; Sigma-aldrich Co., USA) při 37 °C po dobu 3 h a ihned poté proteinázou K (100 µg/ml; Promega Co., USA) při 55 °C po dobu 2 hodin. Po provedení ultrazvuku (Sonic & Materials Inc., USA) cyklováním 20× 10sekundový pulz při ledovém výkonu nastaveném na 10 W s 5sekundovými přestávkami mezi pulzy byla suspenze doplněna stejným objemem n-butylalkoholu a směs byla poté 2 hodiny třepána na orbitální třepačce při pokojové teplotě, následovala centrifugace při 13 000× g po dobu 15 min, horní fáze byla odstraněna odsátím a spodní fáze byla přenesena do standardních RC dialyzačních membránových hadiček (Spectrum Laboratories Inc., USA) v 0,1 M citrátu sodném s 15% n-propylalkoholem během 12 hodin, aby se LTA rozpustila. Přípravek reagoval s oktyl-sefárou CL-4B Fast flow (GE Healthcare Life Sciences, Švédsko) a LTA byla eluována lineárním gradientem (15 až 60 % n-propylalkoholu v 0,1 M citrátu sodného) v iontové výměnné chromatografii s DEAE-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences, USA). Každá frakce (3 ml) byla podrobena testu na anorganický fosfát s molybdenanem amonným, aby se ověřilo, zda obsahuje LTA, a frakce obsahující LTA byly sloučeny a lyo-

filizovány. V dalším experimentu byl LPS izolován z *P. gingivalis* a *T. forsythia* metodou popsanou autorem Lee SH. Bakterie byly odebrány centrifugací při 7 000× g po dobu 5 minut při 4 °C a dvakrát promyty fosfátovým pufrém (PBS, pH 7,2). Bakteriální pelet byl lyzován lyzačním pufrém s fenolem, DNázou a RNázou. Směs se vortexovala, dokud peleta nezmizela, a poté se do směsi přidal chloroform. Po 10sekundovém vortexování směsi byl přípravek odstředován při 13 000× g po dobu 15 minut při 4 °C a supernatant byl přenesen do nové zkumavky. Supernatant byl inkubován s endonukleázou (100 jednotek/ml) (Merck Millipore, Německo) při 37 °C po dobu 2 hodin a ošetřen proteinázou K (200 µg/ml) (Promega Co.) při 55 °C během 1 hodiny. Preparát byl smíchán s lyzačním pufrém a chloroformem podle výše popsaného protokolu. Supernatant byl smíchán s isopropylalkoholem a LPS byl získáván centrifugací 12 000× g po dobu 15 minut a promyt 75% ethylalkoholem. LPS byl rozpuštěn ve vodě bez endotoxinů a zmrazen při –80 °C. Po lyofilizaci byla změřena hmotnost sušiny LPS.

Značení LPS a LTA fluorescencí a biotinem

Extrahovaný LPS (1 mg) z *P. gingivalis* a *T. forsythia* nebo extrahovaná LTA (1 mg) z *F. alocis* reagovaly se studeným metaperiodátem sodným při 4 °C po dobu 30 minut, aby došlo k oxidaci polysacharidové části LPS a LTA, a poté byly dialyzovány ve 100 mM octanu sodného (pH 5,5) po dobu 12 hodin. Roztok obsahující LPS nebo LTA byl smíchán s 10 mM hydridem Alexa Fluor 488 (Invitrogen, USA), který byl připraven rozpuštěním s 200 mM KCl a dvakrát dialyzován ve spojovacím pufru (0,1 M fosforečnan sodný, 0,15 M NaCl, pH 7,2) po dobu 6 hodin a následně třikrát dialyzován v 1 l vody bez endotoxinů po dobu 12 hodin. Po vysušení vzorků mrazem byly LPS a LTA značené fluorem 488 rozpuštěny s vodou bez endotoxinů v koncentraci 1 mg/ml. Fluorescenčně značený LPS byl přenesen do nové zkumavky a uložen do –20 °C.

Kultivace a ošetření buněk

Buňky THP-1 jako lidská monocytární buněčná linie byly zakoupeny z Amedican Type Culture Collection a udržovány s médiem RPMI 1640 (Welgene, Korea) doplněným 10% fetálním hovězím sérem (Hyclone, USA) a antibiotiky (100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycin sulfátu) (Welgene). Buňky byly kultivovány přes noc, naneseny na 12jamkovou destičku (SPL Biosciences, Korea) v koncentraci 1 × 10⁶ buněk/ml a ošetřeny povrchovým extraktem ze *S. salivarius* v přítomnosti tepelně inaktivovaného lidského séra (Sigma-aldrich Co., USA).

Při dalším vyšetření byly buňky ošetřeny povrchovým extraktem ze *S. salivarius* v přítomnosti nebo nepřítomnosti LPS *P. gingivalis*, LPS *T. forsythia* a LTA *F. alocis*. Buňky THP-1 byly odebrány pro analýzu signální dráhy pomocí imunitního blotu a exprese RNA pomocí RT-PCR v reálném čase a kulturační supernatanty byly odebrány pro ELISA a uloženy při –70 °C až do měření produkce cytokinů.

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Buňky THP-1 byly sklizeny centrifugací při 2 000× g po dobu 5 minut při 4 °C a ošetřeny soupravou pro izolaci RNA TRIzol (Invitrogen Life Tech., USA) pro extrakci celkové RNA, po které následoval protokol podle metody výrobce. Komplementární DNA byla syntetizována pomocí Maxime RT Premix (iNtRON, Korea). cDNA byla smíchána s 10 µl 2× TB Green Premix EX Taq II (Takara Co., Japonsko), 0,4 µM každého specifického primeru a barvivem ROX II. Poté byla destilovaná voda doplněna na konečný objem 20 µl. Směs byla podrobena 40 cyklům PCR (95 °C po dobu 15 s, 60 °C po dobu 10 s a 72 °C po dobu 33 s) pomocí systému ABI PRISM 7500 real-time PCR (Applied Biosystems, USA). Produkty amplifikace byly analyzovány pomocí disociační křivky, aby se potvrdila specifická amplifikace. Kritický prahový cyklus (Ct) byl definován jako cyklus, při kterém se fluorescence stala detekovatelnou oproti pozadí, a byl nepřímo úměrný logaritmu počátečního počtu templátové cDNA. Hladina glyseraldehyd-3-fosfát dehydrogenázy (GAPDH) byla použita jako referenční hodnota pro normalizaci hladiny exprese a kvantifikaci změny zánětlivých cytokinů. Sekvence primerů pro PCR v reálném čase byly následující: 5-CAG GGA CCT CTC TCT AAT CA-3 a 5-AGC TGG TTA TCT CTC AGC TC-3 pro gen TNF-α; 5-GTG AAG GTG CAG TTT TGC CA-3 a 5-TCT CCA CAA CCC TCT GCA C-3 pro gen IL-8; 5-GTG GTG GAC CTG ACC TGC-3 a 5-TGA GCT TGA CAA AGT GGT CG-3 pro gen GAPDH. ELISA

Kondicionovaná média buněk ošetřených různými molekulami byla odstředována při 7 000× g po dobu 10 minut při 4 °C, aby se odstranily zbytky buněk, a supernatanty byly přeneseny do nové zkumavky. Hladiny TNF-α a IL-8 byly měřeny pomocí soupravy ELISA (R&D systems, Inc., USA) podle protokolu výrobce.

Test vazby LPS a LTA

Pro zkoumání vazby LPS a LTA na buňku byly buňky THP-1 ošetřovány LPS značeným Alexa Fluor 488 nebo LTA v přítomnosti nebo nepřítomnosti LTA ze *S. salivarius* v různých koncentracích při 37 °C po dobu 1 hodiny v inkubátoru s CO₂. Buňky byly odebrány centrifugací při 500× g po dobu 3 minut a třikrát promyty studeným DPBS (Dulbeccův fosfátový pufrovaný roztok, pH 7,2). Vazba LPS a LTA značených Alexou 488 na buňky byla analyzována průtokovou cytometrií (FACS calibur, BD Biosciences, USA). Data byla získána spočítáním 10 000 buněk a v kanálu FL-1 byla detekována vazba LPS a LTA značených Alexa Fluor 488. Data byla analyzována pomocí programu CellQuest (BD Biosciences).

Test vazby na LBP a CD14

Monoklonální Ab proti lidskému LBP (MAB870, R&D Systems, USA) a polyklonální Ab proti lidskému CD14 (AF982, R&D systems) byly rozpuštěny v DPBS v koncentraci 1 µg/ml. Protilátky (50 ng/jamka) byly nanášeny na EIA destičku (Corning Co., USA) při teplotě 4 °C po dobu 12 hodin. Jamky potažené protilátkami byly pětkrát promyty DPBS obsahujícím 0,1 % tween 20 (DPBST) a blokovány 1 % hovězího sérového alba (BSA) v DPBST po dobu 2 hodin za mírného třepání. Rekombinantní lidský LBP (rhLBP, R&D Systems) a lidský CD14 (rhCD14, R&D Systems) byly rozpuštěny v DPBS v koncentraci 2 µg/ml a přidány do vhodné jamky potažené Ab. Destička byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 4 hodin a poté pětkrát promyta DPBST. Biotinem značený LPS nebo LTA byly ošetřovány nebo spoluošetřovány s LTA *S. salivarius* po dobu 2 hodin při pokojové teplotě. Biotinem značený LPS a LTA navázané na rhLBP a rhCD14 reagovaly s 50 µl streptavidinu značeného křenuvou peroxidázou (HRP) (1 µg/ml) v DPBST obsahujícím 2 % BSA po dobu 1 hodiny. Po pětinasobném promytí DPBST byl do jamky přidán roztok 3,3',5,5'-tetramethylbenzidinu (TMB). Destička byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 30 minut a enzymová reakce byla zastavena 1N kyselinou sírovou. Absorbance byla měřena při vlnové délce 450 nm pomocí mikrotitrační čtečky (Biotek, USA).

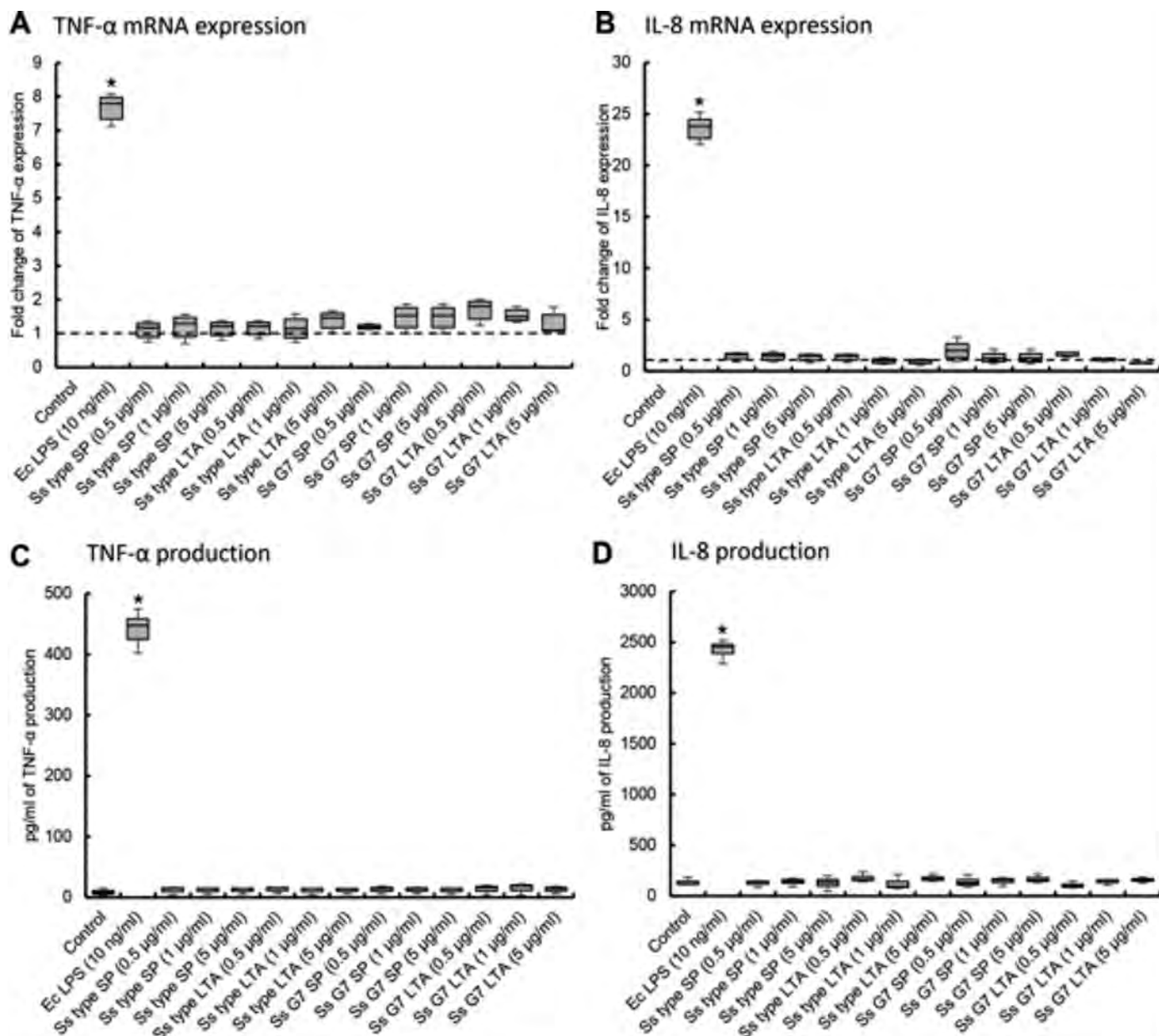
Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu IBM SPSS statics ver. 23 (IBM Co., USA). Rozložení dat bylo zkoumáno Kolmogorov–Smirnovovým testem a rozdíl mezi skupinami dat byl analyzován neparametrickým Kruskal–Wallisovým testem. Statistická významnost mezi skupinami byla definována hodnotou p menší než 0,05. Post-hoc analýza pro porovnání rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla zkoumána pomocí Mann–Whitneyho U testu, který byl korigován pro vícenásobná srovnání Bonferroniho metodou.

Výsledky

Virulence povrchových molekul *S. salivarius*

Nejprve byly ke zkoumání virulence povrchových molekul *S. salivarius* použity povrchové proteiny a LTA. Při působení povrchového proteinu a LTA kmene typu *S. salivarius* a G7 na buňky THP-1 v koncentraci 0,5, 1 a 5 µg/ml nevykazovaly tyto dvě molekuly žádný významný rozdíl v indukcii exprese TNF-α a IL-8 ve srovnání s kontrolou (obr. 1A a 1B). Kromě toho povrchový protein a LTA nevykazovaly významný rozdíl v indukcii produkce TNF-α a IL-8 (obr. 1C a 1D). LPS *E. coli* (10 ng/ml) jako pozitivní kontrola významně indukoval expresi TNF-α a IL-8.



Obr. 1: Vliv povrchového proteinu a LTA *S. salivarius* na indukci exprese TNF-α a IL-8. Buňky THP-1 byly ošetřeny povrchovým proteinem (SP) (0,5, 1 a 5 μg/ml) a LTA (0,5, 1 a 5 μg/ml) *S. salivarius* nebo *E. coli* LPS (10 ng/ml). Expres TNF-α (A, C) a IL-8 (B, D) byla analyzována pomocí real-time RT-PCR (A, B) a ELISA (C, D). Experimenty byly provedeny třikrát ve třech opakováních a údaje jsou znázorněny jako medián (horizontální čáry), mezikvartilové rozpětí (boxy) a plné rozpětí (vousy). Hvězdička (*) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,05$). Přerušovaná čára označuje kontrolní úroveň.

Antagonistický účinek LTA *S. salivarius* na LPS parodontopatogenů

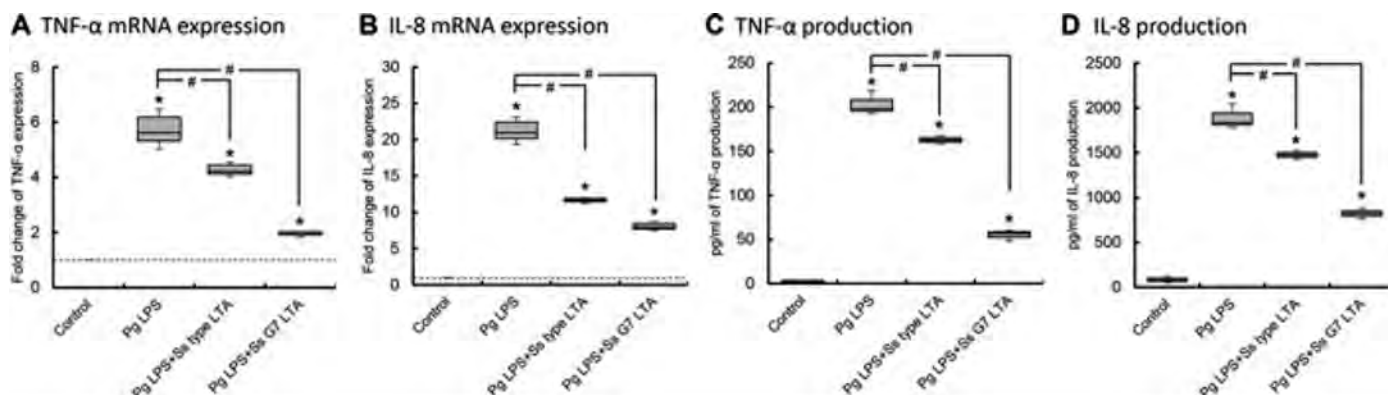
Povrchové proteiny *S. salivarius* neměly vliv na indukci LPS a LTA parodontopatogenů (údaje nejsou uvedeny). LTA *S. salivarius* však vykazovala inhibiční účinek na indukci prozánětlivých cytokinů. LPS *P. gingivalis* indukoval expresi cytokinů jako TNF-α a IL-8 a LTA *S. salivarius* významně inhibovala indukci exprese TNF-α a IL-8 (obr. 2 a S1). Také LTA kmene typu *S. salivarius* a G7 významně snížily expresi cytokinů indukovanou LPS *T. forsythia* (obr. 3 a S2). LTA kmene *S. salivarius* G7 inhiboval expresi cytokinů indukovaných LPS *P. gingivalis* a *T. forsythia* více než LTA kmene typu *S. salivarius*.

Antagonistický účinek LTA *S. salivarius* na LTA *F. alocis*

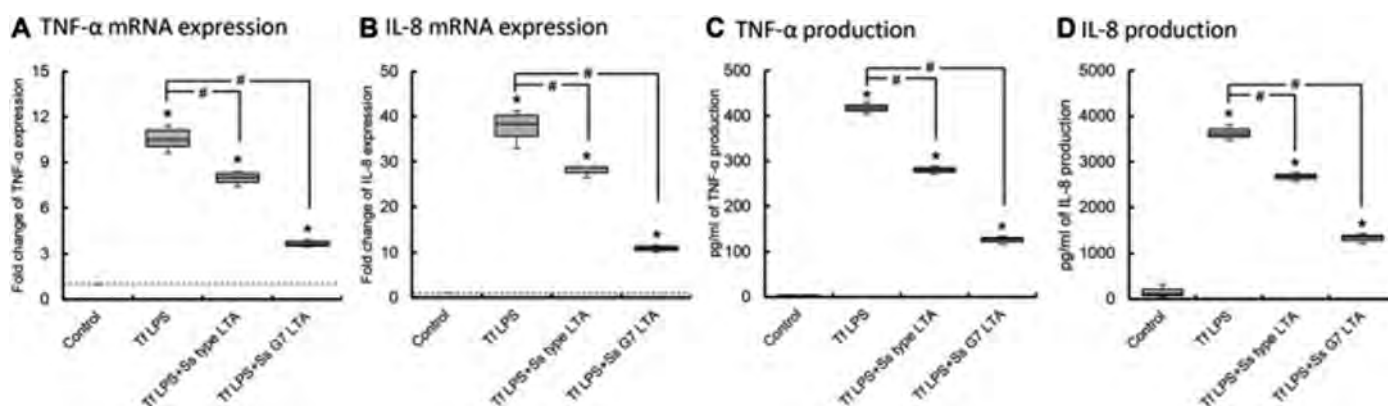
LTA *F. alocis* jako parodontopatogen významně indukovala expresi a produkci TNF-α a IL-8. Jak ukazují obr. 4 a S3, LTA *S. salivarius* významně snížila expresi TNF-α a IL-8 indukovanou LTA *F. alocis*. Při porovnání dvou LTA *S. salivarius* snížila LTA kmene G7 expresi TNF-α a IL-8 indukovanou LTA *F. alocis* více než LTA typového kmene.

Inhibice vazby LTA *S. salivarius*

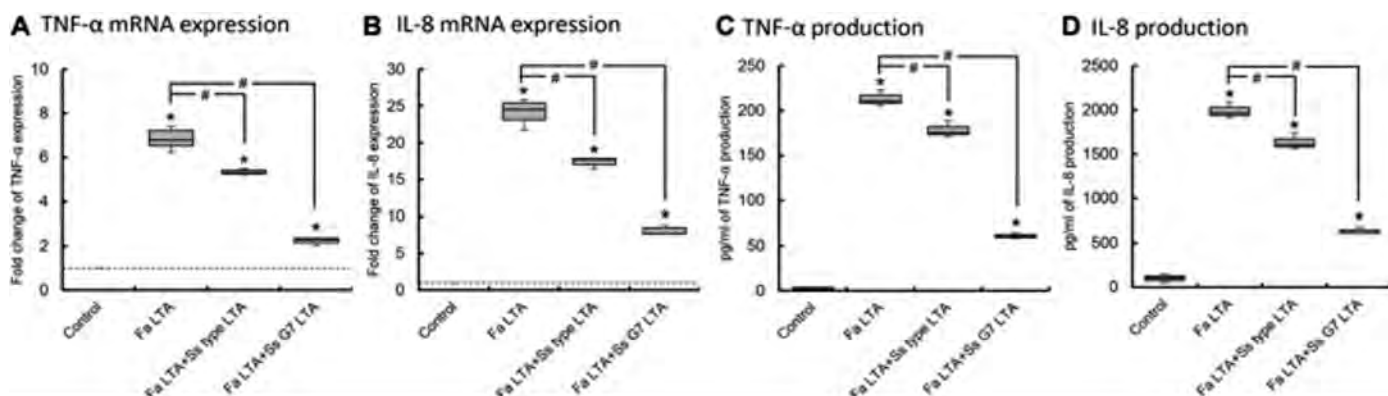
Za účelem prozkoumání mechanismu inhibice LTA *S. salivarius* byly zkoumány reakce LPS a LTA probíhající ve vnějších buňkách. Po fluorescenčním značení LPS a LTA z parodontopatogenů byly značené LPS a LTA kotevovány na buňkách THP-1 s LTA *S. salivarius*. Hladina vazby LPS *P. gingivalis* a *T. forsythia* na buňky byla potlačena v přítomnosti LTA *S. salivarius* (obr. 5A a 5B). Vazba LTA *F. alocis* na buňky byla rovněž snížena LTA *S. salivarius* G7 a typovým kmenem (obr. 5C). V souladu s tendencí inhibice cytokinů snižovala LTA *S. salivarius* G7 vazbu LPS a LTA parodontopatogenů více než LTA typového kmene *S. salivarius*.



Obr. 2: Inhibiční účinek LTA *S. salivarius* na indukci exprese TNF-α a IL-8 LPS *P. gingivalis*. Buňky THP-1 byly současně ošetřeny LTA *S. salivarius* (1 µg/ml) a LPS *P. gingivalis* (100 ng/ml) a exprese TNF-α (A, C) a IL-8 (B, D) byla měřena pomocí real-time RT-PCR (A, B) a ELISA (C, D). Experimenty byly provedeny třikrát ve třech opakováních a hvězdička (*) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,05$). Symbol mřížky (#) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s buňkou ošetřenou LPS *P. gingivalis* ($p < 0,017$). Údaje jsou znázorněny jako medián (horizontální čáry), mezikvartilové rozpětí (boxy) a plné rozpětí (vousy). Přerušovaná čára označuje kontrolní úroveň.



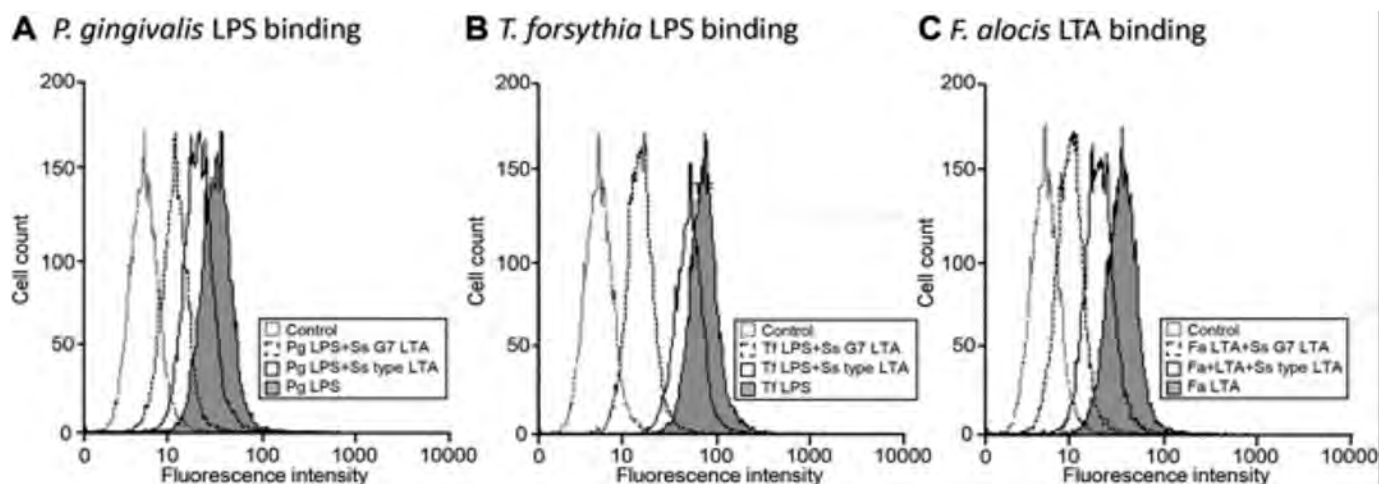
Obr. 3: Inhibiční účinek LTA *S. salivarius* na indukci exprese TNF-α a IL-8 LPS *T. forsythia*. Buňky THP-1 byly současně ošetřeny LTA *S. salivarius* (1 µg/ml) a LPS *T. forsythia* (100 ng/ml) a exprese TNF-α (A, C) a IL-8 (B, D) byla měřena pomocí real-time RT-PCR (A, B) a ELISA (C, D). Experimenty byly provedeny třikrát ve třech opakováních a hvězdička (*) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,05$). Symbol mřížky (#) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s buňkou ošetřenou LPS *T. forsythia* ($p < 0,017$). Údaje jsou znázorněny jako medián (horizontální čáry), mezikvartilové rozpětí (boxy) a plné rozpětí (vousy). Přerušovaná čára označuje kontrolní úroveň.



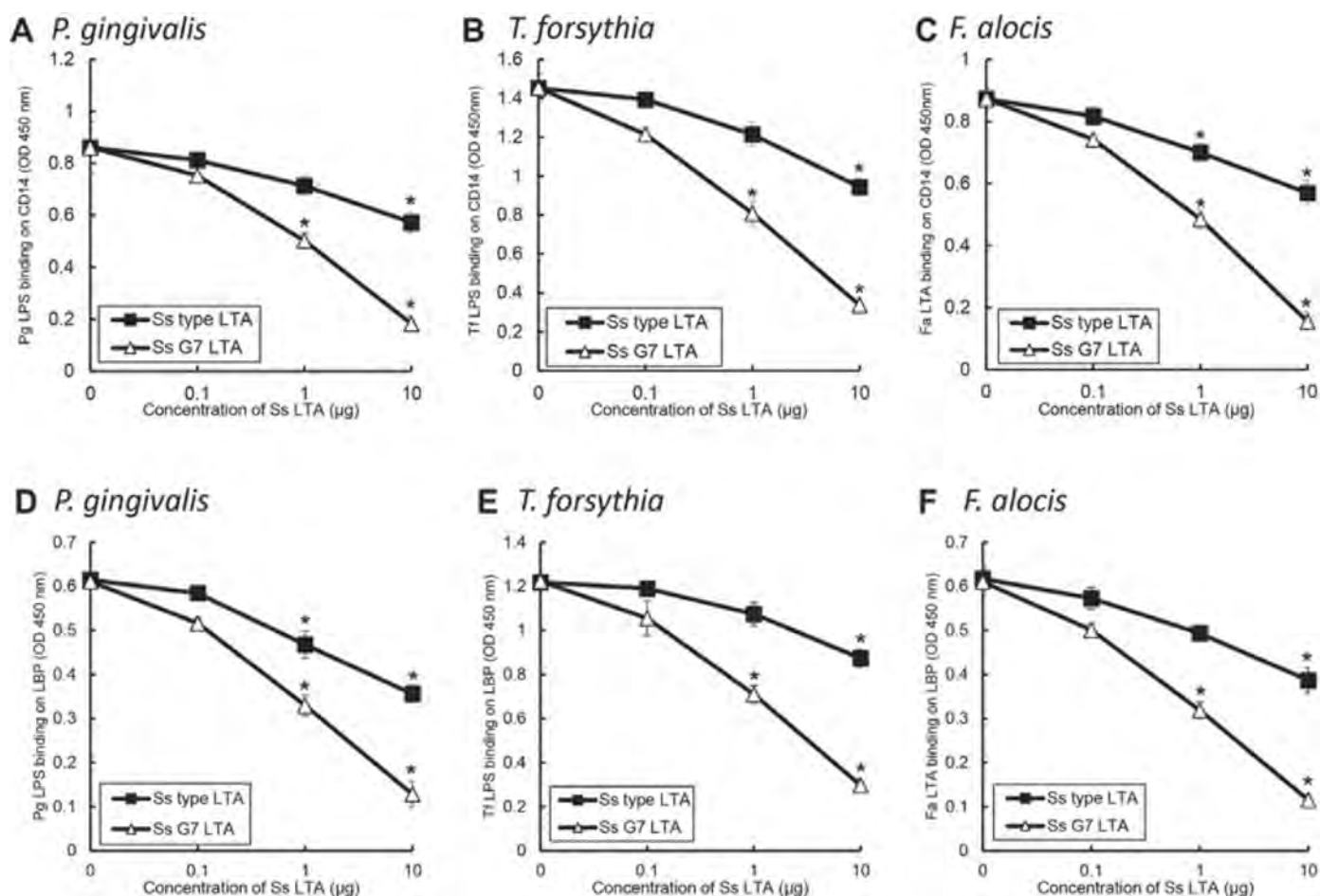
Obr. 4: Inhibiční účinek LTA *S. salivarius* na indukci exprese TNF-α a IL-8 pomocí LTA *F. alocis*. Buňky THP-1 byly současně ošetřeny LTA *S. salivarius* (1 µg/ml) a LTA *F. alocis* (100 ng/ml) a exprese TNF-α (A, C) a IL-8 (B, D) byla měřena pomocí real-time RT-PCR (A, B) a ELISA (C, D). Experimenty byly provedeny třikrát ve třech opakováních a hvězdička (*) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,05$). Symbol mřížky (#) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s buňkou ošetřenou LTA *F. alocis* ($p < 0,017$). Údaje jsou znázorněny jako medián (horizontální čáry), mezikvartilové rozpětí (boxy) a plné rozpětí (vousy). Přerušovaná čára označuje kontrolní úroveň.

Zapojení CD14 a LBP do antagonistického účinku LTA *S. salivarius*

CD14 a LBP se podílejí na vazbě LPS a LTA na buňky a jejich stimulaci [5, 17]. Proto jsme zjišťovali, zda antagonistický účinek LTA *S. salivarius* souvisí s CD14 a LBP. LTA *S. salivarius* inhibovala vazbu LPS *P. gingivalis* a *T. forsythia* na CD14 i LBP (obr. 6). LTA také přerušila vazbu LTA *F. alocis* na CD14 i LBP.



Obr. 5: Inhibice vazby LPS nebo LTA parodontopatogenů pomocí LTA *S. salivarius*. Buňky THP-1 byly inkubovány LPS (100 ng/ml) nebo LTA (100 ng/ml) značenými Alexa Fluor 488 samotných parodontopatogenů nebo s LTA *S. salivarius* (1 µg/ml) po dobu 1 hodiny. Navázaný LPS nebo LTA byly analyzovány průtokovou cytometrií.



Obr. 6: Inhibice vazby LPS nebo LTA parodontopatogenů na CD14 a LBP pomocí LTA *S. salivarius*. EIA destičky byly potaženy rhCD14 (A–C) a rhLBP (D–F). Destičky byly inkubovány biotinylovaným LPS *P. gingivalis* (100 ng/ml), LPS *T. forsythia* (100 ng/ml) a LTA *F. alocis* (100 ng/ml) v přítomnosti nebo nepřítomnosti LTA *S. salivarius* G7 a LTA typového kmene. Navázané LPS a LTA byly detekovány pomocí streptavidinu značeného HRP a roztoku TMB. Experimenty byly provedeny třikrát ve dvou opakováních a data jsou znázorněna jako střední hodnoty a směrodatné odchylky. Hvězdička (*) označuje statisticky významné rozdíly ve srovnání s neléčenou skupinou ($p < 0,05$).

Diskuse

Ústní dutina je charakteristická přítomností více druhů bakterií, stejně jako střevní trakt, a koexistenci měkkých a tvrdých tkání, na rozdíl od střevního traktu. Proto je použití prospěšných bakterií pro ústní dutinu obtížnější než pro stavy v tlustém střevě. Až donedávna byla probiotika vyvíjena za účelem prevence onemocnění ústní dutiny vyvolaných bakteriemi a některé bakterie byly doporučovány jako prospěšné bakterie a postoupily do komerční fáze [19–21]. Některá z těchto probiotik jsou však kyselinotvorná, například *Streptococcus mutans*, který je kariogenní ba-

kteří a může mít škodlivé účinky na zub jako tvrdou tkáň [22, 23]. Proto jsme začali zkoumat příznivé účinky izolovaného *S. salivarius*, který nemá aciditu a je kmenzální bakterií. V této studii jsme nejprve zkoumali inhibiční účinek na zánět. Povrchové molekuly *S. salivarius* G7, povrchový protein a LTA neindukovaly expresi zánětlivých cytokinů. Povrchové molekuly bakterií jsou složky, které se nejprve připojují k buňkám a souvisejí s tvorbou biofilmu. Proto byly nejprve zkoumány vlastnosti povrchových molekul *S. salivarius* a účinky povrchových molekul na LPS a LTA parodontopatogenů, které jsou faktorem vyvolávajícím parodontitidu. Při společném působení LPS a LTA parodontopatogenů s povrchovými molekulami *S. sali-*

varius G7 na buňky inhibovala LTA *S. salivarius* G7 indukci exprese zánětlivých cytokinů LPS a LTA parodontopatogenů, jako jsou *P. gingivalis*, *T. forsythia* a *F. alocis*. Povrchový protein *S. salivarius* G7 neměl vliv. Obecně se LPS a LTA vážou a stimulují Toll-like receptor (TLR) 4, respektive 2 [24]. LPS *T. forsythia* aktivuje lidskou buňku prostřednictvím TLR4 a LPS *P. gingivalis* stimuluje lidskou buňku prostřednictvím TLR2 a TLR4 v závislosti na koncentraci heminu [17, 25]. LTA *F. alocis* také aktivuje TLR2 [5]. Za účelem analýzy mechanismu inhibičních účinků LTA *S. salivarius* G7 na LPS a LTA parodontopatogenů byla proto nejprve zkoumána vazba jeho LPS a LTA na buňky. *S. salivarius* G7 LTA inhiboval vazbu LPS a LTA parodontopatogenů na buňky. Je známo, že LTA stimuluje buňky vazbou na heterodimery TLR2 a TLR6 [26]. Pokud se LTA *S. salivarius* G7 nejprve naváže na TLR2 a inhibuje vazbu jiného ligandu na TLR2, nemůže dojít k inhibici aktivity LPS *T. forsythia* na buňku. *Treponema medium* a glykolipid *T. socranskii* mají antagonistickou aktivitu vůči ligandu TLR4 [27, 28] a LPS *Capnocytophaga ochracea* a *P. gingivalis* také vykazovaly antagonismus vůči LPS *Escherichia coli* jako ligandu TLR4 [29]. Jak se ukázalo v těchto studiích, většina studií uvádí antagonistický účinek ligandu pro stejný receptor a není známo, že by tato LTA měla inhibiční účinek jak na LPS, tak na LTA jako v této studii. Navíc inhibice vazby LTA *S. salivarius* G7 nebyla bez séra jasně pozorována. Nakonec jsme hodnotili, zda antagonistický účinek LTA *S. salivarius* G7 na LTA a LPS parodontopatogenů souvisí s CD14 a LBP. Působení LBP a CD14 je nezbytné k tomu, aby se LPS a LTA vážaly na TLR a stimulovaly je [24]. LPS a LTA tvoří ve vodném roztoku micely díky hydrofilní (O-antigen LPS a glycerol-fosfátová jednotka LTA) a hydrofobní jednotce (lipid A u LPS a diacylový řetězec LTA) [17, 30]. Micelovaný LPS a LTA jsou transportovány LBP na CD14, který koncentruje LPS a LTA na TLR4, respektive TLR2 [31, 32]. Jak ukazují výsledky, LTA *S. salivarius* G7 inhibuje vazbu

LPS a LTA parodontopatogenů na LBP a CD14 v závislosti na dávce. Struktura LTA popisuje glykolipidovou kotvu obsahující diacylglycerol a kovalentně spojenou polymerní páteř (tzv. glycerol-fosfátové jednotky) [33] a diacylové řetězce jako mastné kyseliny v LTA připojují heterodimery TLR2 a TLR6 [26]. Strukturní odlišnosti diacylového řetězce proto naznačují rozdíly v bioaktivitě [34]. Podrobněji se připojení a stimulace diacylového řetězce pro TLR2 liší podle počtu atomů uhlíku a v závislosti na struktuře jeho glycerol-fosfátových jednotek se liší vazba na CD14 a LBP [35, 36]. Na základě těchto studií má LTA *S. salivarius* G7 vazebné místo pro CD14 a LBP, ale její acylový řetězec nemusí stimulovat TLR2. Kromě toho se LTA *S. salivarius* G7 váže na CD14 a LBP a spotřebovává je, čímž snižuje vazbu LPS nebo LTA parodontopatogenů na CD14 a LBP. V konečném důsledku může dojít ke snížení přenosu LPS nebo LTA parodontopatogenů na TLR. Těmito mechanismy by LTA *S. salivarius* G7 mohla inhibovat parodontopatogenní LPS nebo LTA indukovaný zánět. Souhrnně lze říci, že povrchové molekuly *S. salivarius* G7 neovlivnily indukci exprese zánětlivých cytokinů. Pokud jde o povrchové molekuly, vykazovala LTA *S. salivarius* G7 inhibiční aktivitu vůči zánětlivým cytokinům indukovaným LPS nebo LTA parodontopatogenů. Tyto inhibiční účinky mohou být navíc způsobeny inhibicí vazby LPS a LTA parodontopatogenů na CD14 a LBP, které jsou nezbytné pro připojení buněčných receptorů.

Závěrem lze uvést, že povrchové molekuly *S. salivarius* G7 neindukovaly expresi zánětlivých cytokinů a LTA *S. salivarius* G7 inhibovala expresi zánětlivých cytokinů indukovaných LPS *P. gingivalis* a *T. forsythia* nebo LTA *F. alocis*. Protizánětlivý mechanismus LTA *S. salivarius* G7 byl prokázán jeho inhibičním účinkem na konkurenci s LPS a LTA parodontopatogenů při připojování CD14 a LBP. *S. salivarius* G7 může být kandidátem na prevenci parodontitidy vyvolané LPS a LTA bakteriemi.

Prohlášení o střetu zájmu: Autoři nemají žádný finanční střet zájmů, který by museli deklarovat.

Poděkování: Tato studie byla podpořena výzkumným fondem Dankook University v roce 2020.

Přijato: 2. února 2023. Akceptováno: 28. února 2023

Literatura

- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. 2014. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 64: 57-80.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25: 134-144.
- Aruni AW, Mishra A, Dou Y, Chioma O, Hamilton BN, Fletcher HM. 2015. Filifactor alocis—a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect.* 17: 517-530.
- Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Sanches PF, Gomes BP. 2012. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *J. Endod.* 38: 158-162.
- Yoo HJ, Lee SH. 2022. Virulence of Filifactor alocis lipoteichoic acid on human gingival fibroblast. *Arch. Oral Biol.* 135: 105370.
- Park HK, Shim SS, Kim SY, Park JH, Park SE, Kim HJ, et al. 2005. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J. Microbiol.* 43: 345-353.
- Carlsson J, Grahnen H, Jonsson G, Wikner S. 1970. Early establishment of Streptococcus salivarius in the mouth of infants. *J. Dent. Res.* 49: 415-418.
- Bourdichon F, Budde-Niekkel A, Dubois A, Fritz D, Hatte J, Laulund S, et al. 2018. Bulletin of the IDF No 495/2018; Inventory of Microbial Food Cultures with Safety Demonstration in Fermented Food Products: Update of the Bulletin of the IDF No. 455, 2012, pp. Ed. International Dairy Federation.
- Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. 2012. Developing oral probiotics from Streptococcus salivarius. *Future Microbiol.* 7: 1355-1371.
- Masdea L, Kulik EM, Hauser-Gerspach I, Ramseier AM, Filippi A, Waltimo T. 2012. Antimicrobial activity of Streptococcus salivarius K12 on bacteria involved in oral malodour. *Arch. Oral Biol.* 57: 1041-1047.
- Staskova A, Sondorova M, Nemcova R, Kacirova J, Madar M. 2021. Antimicrobial and antibiofilm activity of the probiotic strain Streptococcus salivarius K12 against oral potential pathogens. *Antibiotics (Basel)* 10.
- Jansen PM, Abdelbary MMH, Conrads G. 2021. A concerted probiotic activity to inhibit periodontitis-associated bacteria. *PLoS One* 16: e0248308.
- Yoo HJ, Jwa SK, Kim DH, Ji YJ. 2020. Inhibitory effect of Streptococcus salivarius K12 and M18 on halitosis in vitro. *Clin. Exp. Dent. Res.* 6: 207-214.
- Fields FR, Li X, Navarre WW, Naito M. 2020. Complete genome sequence of Streptococcus salivarius DB-B5, a novel probiotic candidate isolated from the supragingival plaque of a healthy female subject. *Microbiol. Resour. Annu.* 9: e00916-20.
- Poorni S, Nivedhitha MS, Srinivasan M, Balasubramanian A. 2022. Effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 and M18 lozenges on the cariogram parameters of patients with high caries risk: a randomised control trial. *Cureus* 14: e23282.
- Srikham K, Daengprok W, Niamsup P, Thirabunyanon M. 2021. Characterization of Streptococcus salivarius as new probiotics derived from human breast milk and their potential on proliferative inhibition of liver and

breast cancer cells and antioxidant activity. *Front. Microbiol.* 12: 797445.

- Kim YJ, Lee SH. 2014. Reducing the bioactivity of Tannerella forsythia lipopolysaccharide by Porphyromonas gingivalis. *J. Microbiol.* 52: 702-708.
- Tiong HK, Hartson S, Muriana PM. 2015. Comparison of five methods for direct extraction of surface proteins from Listeria monocytogenes for proteomic analysis by orbitrap mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods* 110: 54-60.
- Romani Vestman N, Chen T, Lif Holgersson P, Ohman C, Johansson I. 2015. Oral microbiota shift after 12-week supplementation with Lactobacillus reuteri DSM 17938 and PTA 5289; a randomized control trial. *PLoS One* 10: e0125812.
- Anusha RL, Umar D, Basheer B, Baroudi K. 2015. The magic of magic bugs in oral cavity: probiotics. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 6: 43-47.
- Bowen DM. 2013. Probiotics and oral health. *J. Dent. Hyg.* 87: 5-9.
- Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, Perry K, Stemmer WP, Ryan CM, et al. 2002. Genome shuffling of Lactobacillus for improved acid tolerance. *Nat. Biotechnol.* 20: 707-712.
- Wang RM, Li N, Zheng K, Hao JF. 2018. Enhancing acid tolerance of the probiotic bacterium Lactobacillus acidophilus NCFM with trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.* doi: 10.1093/femsec/fmy217. Online ahead of print.
- Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499-511.
- Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. 2006. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 74: 4474-4485.
- Henneke P, Morath S, Uematsu S, Weichert S, Pfitzenmaier M, Takeuchi O, et al. 2005. Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B streptococcus. *J. Immunol.* 174: 6449-6455.
- Asai Y, Hashimoto M, Ogawa T. 2003. Treponemal glycoconjugate inhibits Toll-like receptor ligand-induced cell activation by blocking LPS-binding protein and CD14 functions. *Eur. J. Immunol.* 33: 3196-3204.
- Lee SH, Kim KK, Rhyu IC, Koh S, Lee DS, Choi BK. 2006. Phenol/water extract of Treponema socranskii subsp. socranskii as an antagonist of Toll-like receptor 4 signalling. *Microbiology (Reading)* 152: 535-546.
- Yoshimura A, Kaneko T, Kato Y, Golenbock DT, Hara Y. 2002. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria Porphyromonas gingivalis and Capnocytophaga ochracea are antagonists for human Toll-like receptor 4. *Infect. Immun.* 70: 218-225.
- Wicken AJ, Evans JD, Knox KW. 1986. Critical micelle concentrations of lipoteichoic acids. *J. Bacteriol.* 166: 72-77.
- Schroder NW, Schumann RR. 2005. Non-LPS targets and actions of LPS binding protein (LBP). *J. Endotoxin. Res.* 11: 237-242.
- Sugawara S, Arakaki R, Rikiishi H, Takada H. 1999. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14-dependent manner. *Infect. Immun.* 67: 1623-1632.
- Fischer W. 1994. Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of Staphylococcus aureus. *Med. Microbiol. Immunol.* 183: 61-76.
- Han SH, Kim JH, Martin M, Michalek SM, Nahm MH. 2003. Pneumococcal lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as staphylococcal LTA in stimulating Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 71: 5541-5548.
- Jimenez-Dalmaroni MJ, Radcliffe CM, Harvey DJ, Wormald MR, Verdino P, Ainge GD, et al. 2015. Soluble human TLR2 ectodomain binds diacylglycerol from microbial lipopeptides and glycolipids. *Innate Immun.* 21: 175-193.
- Hermann C, Spreitzer I, Schroder NW, Morath S, Lehner MD, Fischer W, et al. 2002. Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species—role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release. *Eur. J. Immunol.* 32: 541-551.

Probiotické řešení atopické dermatitidy a alergické rýmy

favea +
pro vaše zdraví

Bactodermal

PODPORA ZDRAVÉ POKOŽKY BĚHEM VÝVOJE DĚTÍ A SPRÁVNÉ FUNKCE KOŽNÍ IMUNITY U DOSPĚLÝCH

Bactodermal je doplněk stravy obsahující kombinaci patentovaného probiotika (*Lactobacillus paracasei* (GMNL-32&GMNL-133)) s vitamíny zaměřený na harmonizaci fyziologických procesů, pro normální funkci imunitního systému a tím i zdraví pokožky během vývoje dětí a podporu správné funkce kožní imunity u dospělých. Biotin přispívá k udržení zdravého stavu pokožky a vitamin D přispívá ke správné funkci imunitního systému. **Péče o atopickou pokožku začíná ve střevě.**



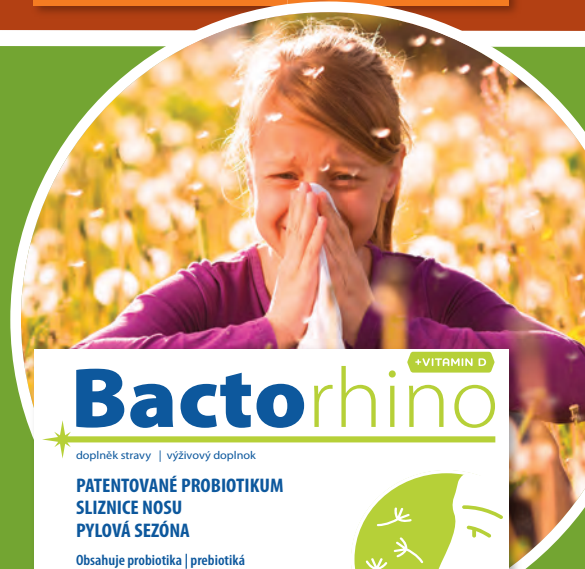
Bactorhino

+VITAMIN D

PATENTOVANÉ PROBIOTIKUM SLIZNICE NOSU — PYLOVÁ SEZÓNA

RHINO ZYN

Bactorhino je unikátní doplněk stravy obsahující kombinaci důležitého patentovaného probiotika s vitamínem D zaměřený na harmonizaci fyziologických procesů, pro správnou funkci imunitního systému a k normální hladině vápníku v krvi, což také podporuje správnou funkci slizniční imunity dětí i dospělých.

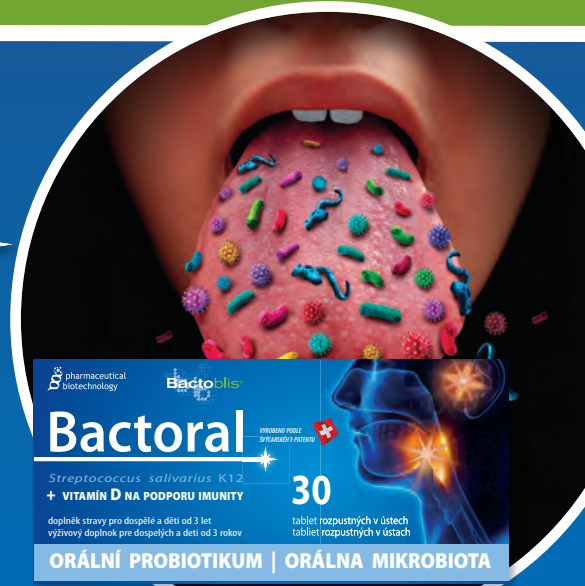


Bactoral

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM MIKROBIOTA PRO DUTINU ÚSTNÍ

Bactoblis

Obsahuje patentovanou probiotickou kulturu *Streptococcus salivarius* K12 a vitamin D na podporu imunity. Tato bakterie dokáže zaujmout strategické pozice v dutině ústní, nosohltanu a středouší a dokáže vytěsnit nežádoucí druhy. Vitamin D přispívá ke správné funkci imunitního systému.



BACTORAL S VITAMÍNEM D PRO POSÍLENÍ VAŠÍ IMUNITY



Bactoral

**+ vitamín D
na podporu imunity**

**ORIGINAL
JE JEN
JEDEN**

ORÁLNÍ PROBIOTIKUM

Mikrobiota pro dutinu ústní

Obsahuje patentovanou probiotickou kulturu ***Streptococcus salivarius* K12** a **vitamín D** na podporu imunity. Tato bakterie dokáže zaujmout **strategické pozice v dutině ústní, nosohltanu a středouší** a **dokáže vytěsnit nežádoucí druhy**. Vitamín D přispívá ke **správné funkci imunitního systému**.

VYROBENO PODLE
ŠVÝCARSKÉHO PATENTU



favea 
pro vaše zdraví

NOVINKA

Bactoral
Streptococcus salivarius K12
+ VITAMÍN D NA PODPORU IMUNITY
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
ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNÁ MIKROBIOTA

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
vrecušok
Obsahuje patentované probiotikum a prebiotikum
doplňek stravy
výživový doplnok
ORÁLNÍ PROBIOTIKUM | ORÁLNÁ MIKROBIOTA

Bactoral IMUNO
Lactobacillus paracasei, L. CASEI 431®
Streptococcus salivarius K12
První kombinace probiotických kmenů kolonizujících
a chránících jak střevo, tak sliznice úst a hltanu.
doplňek 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
GENUÍNE K12 FORNICA
PREMIUM PROBIOTIC PROTECTION
MAYOVA PŘÍLOHA
favea

K dostání ve Vaší lékárně nebo na www.faveaplus.cz

K dostaniu tiež na Slovensku.