

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Suplementy na bázi monolaurinů pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu

Bc. Michaela Sluková

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Sluková**
Osobní číslo: **C18496**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Suplementy na bázi monolaurinů pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Vypracujte literární rešerši na téma lidský mikrobiom zažívacího traktu.

Charakterizujte beta-aescin ve vztahu k jejich biologické aktivitě.

Popište mikrobiologické metody hodnocení kosmetických výrobků, zejména ČSN EN ISO 11930

- Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku.

Seznamte se s metodou stanovení baktericidní, fungicidní a levurocidní účinnosti antiseptických léčivých přípravků dle aktualizovaného lékopisu.

Experimentální část:

U testovaných látek proveďte mikrobiologické hodnocení účinků, dosažené kriticky zhodnoťte v diskusi.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

Prohlášení

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1.7. 2020

.....

Michaela Sluková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat paní doc. Ing. Marcele Pejchalové Ph.D. za veškeré poskytnuté rady, trpělivost a ochotný přístup při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantce Drahomíře Hofmanové za pomoc v laboratoři. Ještě bych chtěla poděkovat firmě K2 Pharm s.r.o. za poskytnuté vzorky. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině a kamarádům, kteří mě po celou dobu studia a práce podporovali.

Anotace

Diplomová práce se věnuje testování suplementům na bázi monolaurinu, který má pozitivní vliv na ovlivnění lidského mikrobiomu. Teoretická část je věnována lidskému mikrobiomu, testovaným látkám, patogenním mikroorganismům a normě ČSN EN ISO 11930. Praktická část se zaměřuje na testování vzorků podle zmíněné normy, a také podle Českého lékopisu.

Klíčová slova

Lidský mikrobiom, norma ČSN EN ISO 11930, lidské patogenní mikroorganismy, monolaurin, β -aescin

Title

Supplements based on monolaurin for positive influence on human microbiome

Annotation

The diploma thesis deals with testing of supplements based on monolaurin, which has got a positive effect on the human microbiome. The theoretical part is devoted to the human microbiome, tested substances, pathogenic microorganisms and the standard ČSN EN ISO 11930. The practical part focuses on testing samples according to the mentioned standard and as well according to Český lékopis.

Keywords

Human microbiome, standard ČSN EN ISO 11930, human pathogenic microorganism, monolaurin, β -aescin

Obsah

Úvod.....	15
1 Teoretická část	16
1.1 Mikrobiom lidského těla.....	16
1.1.1 Mikrobiom gastrointestinální soustavy.....	17
1.1.1.1 Fekální mikrobiální transplantace	20
1.1.1.2 Probiotika, prebiotika a synbiotika.....	20
1.1.2 Mikrobiom kožní soustavy	21
1.1.3 Mikrobiom dutiny ústní	23
1.2 Testované mikroorganismy.....	24
1.2.1 Bakterie.....	24
1.2.1.1 Escherichia coli (E. coli)	24
1.2.1.1.1 Enterohemoragické <i>E. coli</i> (EHEC).....	26
1.2.1.1.2 Enterotoxigenní <i>E. coli</i> (ETEC).....	26
1.2.1.1.3 Enteropatogenní <i>E. coli</i> (EPEC)	27
1.2.1.1.4 Enteroagregativní <i>E. coli</i> (EAEC).....	27
1.2.1.1.5 Enteroinvazivní <i>E. coli</i> (EIEC)	27
1.2.1.1.6 Extraintestinální patogenní <i>E. coli</i> (ExPEC),.....	28
1.2.1.2 Enterococcus hirae (E. hirae)	28
1.2.1.3 Listeria monocytogenes (L. monocytogenes).....	29
1.2.1.3.1 Listeriόza.....	30
1.2.1.4 Proteus spp.....	31
1.2.1.5 Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa).....	32
1.2.1.6 Salmonella enterica (S. enterica).....	33
1.2.1.6.1 Neinvazivní, netyfoifní salmonelόza	35
1.2.1.6.2 Invazivní, tyfoidní salmonelόza	35
1.2.1.6.3 Břišní tyfus	35

1.2.1.7	Staphylococcus aureus (S. aureus)	36
1.2.1.7.1	Infekce krevního řečiště	37
1.2.1.7.2	Infekce kůže a měkkých tkání	37
1.2.1.7.3	Osteoartikulární infekce	37
1.2.2	Kvasinky a plísně	38
1.2.2.1	Candida albicans (C. albicans)	38
1.2.2.2	Aspergillus brasiliensis (A. brasiliensis)	38
1.3	Monolaurin	40
1.3.1	Struktura monolaurinu	40
1.3.2	Syntéza monolaurinu	41
1.3.3	Antibakteriální účinky	41
1.3.4	Antivirulentní účinky	42
1.3.5	Antimykotické účinky	42
1.3.6	Další účinky	42
1.4	β -Aescin	43
1.4.1	Struktura β -Aescinu	43
1.5	Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku podle normy ČSN EN ISO 11930	44
1.6	Stanovení baktericidní, levurocidní a fungicidní účinnosti antiseptických léčivých přípravků podle Českého lékopisu	46
2	Experimentální část	48
2.1	Vzorky	48
2.2	Použité mikroorganismy	49
2.3	Kultivační média a pracovní roztoky	49
2.4	Chemikálie	51
2.5	Laboratorní přístroje	51
2.6	Laboratorní pomůcky	52
2.7	Metodika	53

2.7.1	Postup č. 1 – Neutralizační ředění	53
2.7.2	Postup č. 2 – Baktericidní, levurocidní a fungicidní účinek.....	56
3	Výsledky a diskuse	60
3.1	Testování 1 - norma ČSN EN ISO 11930.....	60
3.2	Testování 2 – dle Českého lékopisu (ČSL)	70
4	Závěr	85
5	Použitá literatura	87
6	Přílohy.....	94

Seznam obrázků

Obrázek 1: Zastoupení mikroorganismů v gastrointestinální soustavě (Yadav et al., 2018) ...	19
Obrázek 2: Escherichia coli CCM 8874 a CCM 5172 na TSA	25
Obrázek 3: Kolonie Enterococcus hirae na KA (Oh et al., 2019)	29
Obrázek 4: Schéma infekce Listeria monocytogenes (Radoshevich, Cossart, 2018).....	30
Obrázek 5: Relativní četnost typů pigmentů produkovaných kmeny P. aeruginosa (Rodulfo et al., 2019)	32
Obrázek 6: Rozdělení kmene Salmonella (Deker, Frank, 2015)	34
Obrázek 7: Patogenní druhy Aspergillus na Czapek-Dox agaru (Sugui et al., 2014)	39
Obrázek 8: 3D konformace monolaurinu	40
Obrázek 9: Syntéza monolaurinu (Han et al., 2019).....	41
Obrázek 10: Molekulová struktura β -Aescinu (Geisler et al., 2020).....	43
Obrázek 11: Počítadlo v laboratoři L1	54
Obrázek 12: Schéma metody	59

Seznam tabulek

Tabulka 1: Probiotika, prebiotika a synbiotika (Markowiak, Śliżewska, 2017).....	21
Tabulka 2: Kritéria hodnocení antimikrobiální ochrany pro bakterie a kvasinky podle ČSN EN ISO 11930.....	55
Tabulka 3: Složení vzorků	60
Tabulka 4: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLaurin OA88729 vůči testovaným bakteriím a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	61
Tabulka 5: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLaurin OA88730 vůči testovaným bakteriím a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	62
Tabulka 6: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % SE MONOLaurin OA88729 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	65
Tabulka 7: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLaurin OA88729 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	65
Tabulka 8: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % SE MONOLaurin OA88730 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	65
Tabulka 9: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLaurin OA8830 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	66
Tabulka 10: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 0,1 % MONOLaurin SE OA92502 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	67
Tabulka 11: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % MONOLaurin SE OA92502 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	67
Tabulka 12: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % MONOLaurin SE OA92502 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.....	68
Tabulka 13: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 0,01 % β-Aescinu OA9250 vůči testovaným bakteriálním kmenům a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.	69
Tabulka 14: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 0,1 % β-Aescinu OA9250 vůči testovaným bakteriálním kmenům a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.	69
Tabulka 15: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % β-Aescinu OA9250 vůči testovaným bakteriálním kmenům a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.	70

Tabulka 16: Výsledky z testování <i>Enterococcus hirae</i> CCM 2423 pro 10 % vzorky monolaurinů.....	71
Tabulka 17: Výsledky z testování <i>Enterococcus hirae</i> CCM 2423 pro 1 % vzorky monolaurinů.....	72
Tabulka 18: Výsledky z testování <i>Escherichia coli</i> CCM 4517 pro 10 % vzorky monolaurinů	73
Tabulka 19: Výsledky z testování <i>Escherichia coli</i> CCM 4517 pro 1 % vzorky monolaurinů	74
Tabulka 20: Výsledky z testování <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961 pro 10 % vzorky monolaurinů.....	75
Tabulka 21: Výsledky z testování <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961 pro 1 % vzorky monolaurinů.....	76
Tabulka 22: Výsledky z testování <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516 pro 10 % vzorky monolaurinů.....	77
Tabulka 23: Výsledky z testování <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516 pro 1 % vzorky monolaurinů.....	78
Tabulka 24: Výsledky z testování <i>Candida albicans</i> CCM 8215 pro 10 % vzorky monolaurinů.....	79
Tabulka 25: Výsledky z testování <i>Candida albicans</i> CCM 8215 pro 1 % vzorky monolaurinů	80
Tabulka 26: Výsledky z testování <i>Aspergillus brasiliensis</i> CCM 8222 pro 10 % vzorky monolaurinů.....	81
Tabulka 27: Výsledky z testování <i>Aspergillus brasiliensis</i> CCM 8222 pro 1 % vzorky monolaurinů.....	82
Tabulka 28: Složení Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS.....	84

Seznam zkratek

A/E	Vazebné a efekční léze
BSA	Hovězí sérový albumin
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemoci
CFU/ml	Kolonie tvořící jednotky na 1 mililitr
CNS	Centrální nervový systém
ČSL	Český lékopis
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EAEC	Enteroagregativní <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EHEC	Enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	Extraintestinální patogenní <i>Escherichia coli</i>
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství Spojených národů
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GI	Gastrointestinální
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný
HEp-2	Lidská buněčná linie derivovaná z karcinomu hrtanu
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
IA	Invazivní aspergilóza
IgA	Slizniční protilátky
LT	Tepelně labilní
MALT	Slizniční lymfatická tkáň
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
MRSA	Methicillin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PDA	Bramboro-glukózový agar
PSMs	Moduliny rozpustné ve fenolu
SCFA	Mastné kyseliny s krátkými řetězci
SDA	Sabouraudův agar
ST	Tepelně stabilní

STEC	Shiga-like toxigenní <i>Escherichia coli</i>
TGF- β	Transformující růstový faktor
TSA	Tryptonový sójový agar
TSST-1	Toxin syndromu toxického šoku
UPEC	Uropatogenní <i>Escherichia coli</i>
VRSA	Vankomycin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
VTEC	Verotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace

Úvod

Mikrobiom je označení pro mikrobiální kolonizaci lidského těla. Jedná se o vysoký zástup jak nepatogenních, ale i patogenních kmenů bakterií, kvasinek, hub či virů. Tato mikrobiální společenství se vyskytují vně celého těla, ale také na povrchu, proto zde hovoříme o různých druzích mikrobiomů, jako je gastrointestinální, kožní či ústní. Množství mikrobů, kteří osidlují naše tělo je různorodé a záleží na různých faktorech, jako je věk, zdraví, rasa a zejména podmínky vnějšího prostředí.

Mikrobiom je pro existenci člověka nezbytný, zastává velmi důležité fyziologické role především vývoj imunity a ochrany organismu proti škodlivým patogenům. Pokud nastane nerovnováha v mikrobiomu mezi organismy, může dojít ke vzniku různých onemocnění od banálních až po fatální.

Lidé se už odjakživa snaží přijít na to, jak některé nemoci léčit či vymýtit. Proto v posledních letech dochází ke vzniku mnoha nových, jak syntetických, tak i přírodních látek, které mohou napomoci tomuto problému. Jedním z největších objevů bylo v minulém století objevení jednoho z nejvíce používaných antibiotik tedy penicilínu. Nicméně na úkor našeho snažení při objevování nových látek se některé mikroorganismy snaží proti těmto látkám chránit, proto dochází k mnoha novým rezistencím na léky.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat finální vzorky na bázi monolaurinu, které budou pozitivně ovlivňovat lidský mikrobiom. Testované vzorky byly podrobeny normě ČSN EN ISO 11930 z roku 2019, která hodnotí antimikrobiální ochrany kosmetických výrobků. Tato norma nás vede krok po kroku k posouzení, zda testované přípravky splňují či nesplňují daná kritéria. Dále byly vzorky také posouzeny podle Českého lékopisu, dle kterého se hodnotí, zda má antiseptický léčivý přípravek baktericidní, levurocidní a fungicidní účinky.

1 Teoretická část

1.1 Mikrobiom lidského těla

Lidské tělo je kolonizováno nespočetným množstvím druhů mikroorganismů, ty mohou být symbiotického, patogenního či komenzálního charakteru. Toto společenství nazýváme lidský mikrobiom (Malla *et al.*, 2019). Mikroorganismy obývají specifická místa v, ale i na těle, jako jsou například ústa, krk, dýchací cesty, žaludek a střevo, urogenitální systém či kůže. Mezi tyto mikroorganismy řadíme především bakterie, dále také viry, houby, protozoa či archea (Blum, 2017).

Vědci odhadují, že tento lidský mikrobiom obsahuje celkem 100 biliónů buněk, což je na počet lidských buněk až desetkrát více. Tedy agregát mikrobiálních genů jednoznačně převyšuje počet genů v samotném lidském genomu, a díky tomu je lidský mikrobiom označován jako „druhý genom“ u lidí (Cong, Zhang, 2018).

Fungující lidský mikrobiom je v těle nezbytný, protože přispívá k hladkému fungování důležitých fyziologických procesů, jako jsou vývoj imunity, ochrana organismu proti škodlivým patogenům, syntéza esenciálních vitamínů či ukládání tuků, a proto je velmi cenný pro lidské zdraví a nemoci. Jedná se o dynamický systém, který se během života každého člověka neustále mění a vyvíjí. Za tyto změny jsou odpovědné především faktory životního prostředí jako jsou strava či používání antibiotik (Amon, Sanderson, 2017).

Pomocí analýz interakcí mezi hostitelem a mikroblem se mohou odhalit základní charakteristiky. Přestože struktura, funkce, dynamika a interakce těchto mikroorganismů, které mají zásadní roli v lidském metabolismu, jejich identifikace, kvantifikace a charakterizace je velmi náročná a problematická, díky tomu, že většina mikrobiálních společenství je velmi rozmanitá a dosud většina jednotlivých organismů nebyla ještě kultivována. Nicméně v poslední době se však pro kvalitativní a kvantitativní identifikaci mikrobů vyvinula řada technik nezávislých na jejich kultivaci, kde je nejčastěji používána metoda PCR. S touto metodou došlo k zavedení metagenetiky. Metagenetické studie nám zcela poskytují užitečné informace použitelné pro širokou škálu odvětví jako je sledování patogenů, biotechnologií, interakcí hostitel-mikrob či funkční dysbiózy. Nicméně tyto studie též pomohly odhalit možné souvislosti mezi střevním mikrobiomem a lidskými nemocemi jako jsou deprese, revmatoidní artritida či diabetes (Cong, Zhang, 2018).

1.1.1 Mikrobiom gastrointestinální soustavy

Největší zastoupení mikroorganismů se nachází právě v naší střevní mikroflóře. Jedná se z 99 % o bakteriální zastoupení. Pouze v lidském tlustém střevě je odhadovaná hustota mikroorganismů kolem 10^{13} bakterií (Gorkiewicz, Moschen, 2018), tato suma odpovídá při ideální hmotnosti 70 kg 1-2 kg celkové tělesné hmotnosti (D'Argenio, Salvatore, 2015).

Střevní mikrobiom je prospěšný pro lidský metabolismus, protože právě tyto střevní mikroby v našem těle dokážou štěpit velké nestravitelné zbytky živin jako je pektin, celulóza a rezistentní škroby (Dugas *et al.*, 2018), dále též vylučují základní živiny včetně mastných kyselin s krátkými řetězci (SCFA), které člověk dokáže absorbovat a používat jako energetické prekurzory pro střevní epitel a játra (Magnúsdóttir, Thiele, 2018). Díky tomu SCFA pává ovlivňují mnoho metabolicky nezbytných procesů v těle včetně jaterní glukoneogeneze a lipogeneze, funkční střevní bariéry a motility střev (Dugas *et al.*, 2018). Jako dalším významným rysem je výchova imunitního systému. Mukózní imunitní systém musí tolerovat rezidentní mikrobiom a zároveň musí také reagovat proti patogenům prostřednictvím indukce protizánětlivých buněk a cytokinů (např. regulační T-buňky, interleukin 10, TGF- β) (Gorkiewicz, Moschen, 2018).

Složení a rozmanitost lidského střevního mikrobiomu je u každého jedince odlišná, a to především díky vnějším faktorům. Liší se podle stavu mikrobiomu, etnického původu, životního stylu každého jedince, též věku či geografického umístění. Také se mikrobiom diferencuje v různých životních obdobích (Cong, Zhang, 2018). Ještě donedávna vědci považovali prostředí dělohy za sterilní, nicméně DNA analýzy identifikovaly bakteriální kmeny již v mateřské placentě, plodové vodě a mekoniu (první stolice novorozence) (Blum, 2017). Uvádí se, že například struktura střevního mikrobiomu se velmi liší od prvního do třetího trimestru těhotenství, u kterého dochází v průběhu času k nárustu rodu *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Cong, Zhang, 2018). Dalším důležitým faktorem prostředí je strava. Díky tomu příbuzní nebo jednotlivci, kteří spolu žijí v jedné domácnosti spolu sdílejí více stejných mikroorganismů než jedinci, kteří nejsou spolu ve spojení (Gorkiewicz, Moschen, 2018).

Podél příčné osy je mikrobiota v gastrointestinálním traktu (GI) prostorově uspořádaná od lumenu až ke sliznici. Nejdůležitější roli zde hraje vrstva hlenu pokrývající tento GI trakt. V žaludku a v tlustém střevě rozlišujeme dvě různé vrstvy, a to vnější „volnou“ vrstvu, která je

hustě obydlená bakteriemi a vnitřní „pevnou“ vrstvu, která je obohacená o vrozené a adaptivní imunitní efekty poskytující biochemickou bariéru, jež odděluje mikrobiotu od přímého kontaktu s epitelem, proto je tato vrstva téměř bez mikrobů. V tenkém střevě je hlenová vrstva nespojitá a méně definovaná, například špičky klků nejsou vždy pokryté (Gorkiewicz, Moschen, 2018).

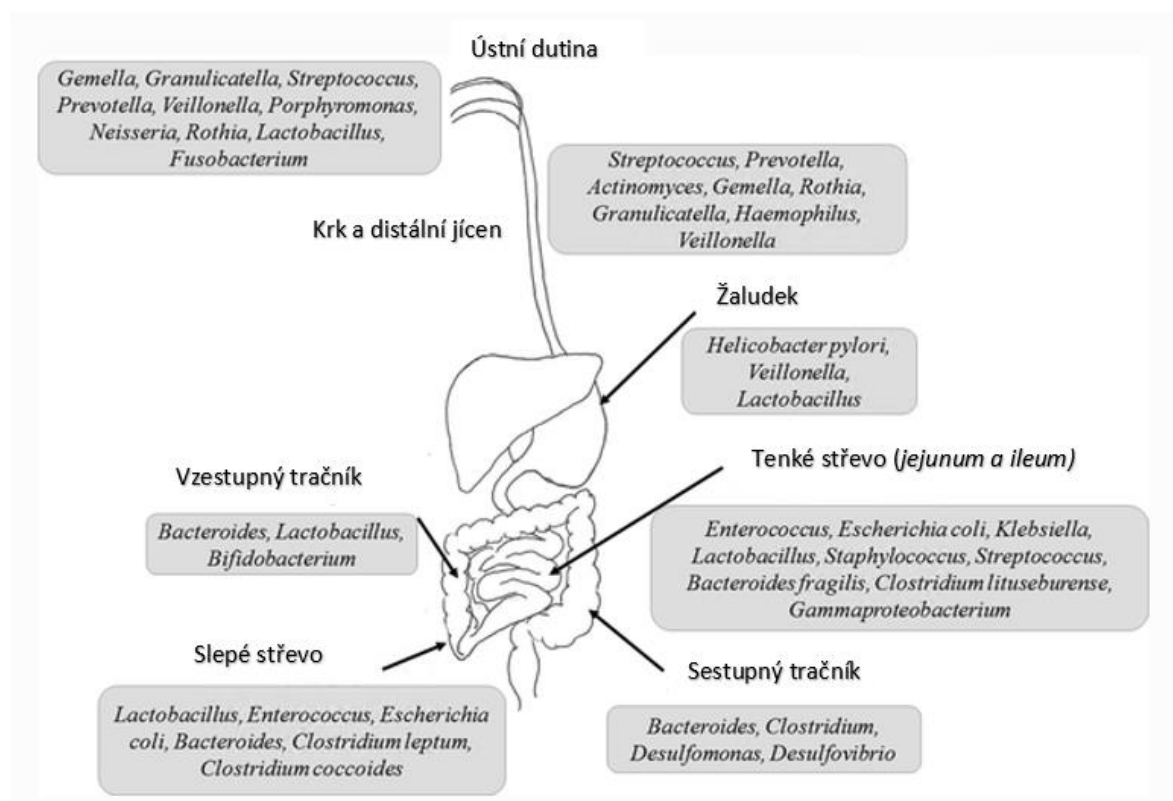
Dříve převládal názor, že žaludek je sterilní kvůli svému kyselému prostředí. Toto tvrzení bylo vyvráceno po objevu *Helicobacter pylori* v roce 1981. Nejdříve byly objeveny jiné mikroorganismy konvenčními metodami včetně histologické analýzy vzorků žaludku či kultivace žaludeční šťávy a žaludeční sliznice. Nejvíce zastoupené kultury za zdravých podmínek se zde nacházely *Clostridium sp*, *Lactobacillus sp* a *Veillonella sp*. Protože prostředí žaludku je velmi drsné a obtížně kolonizované, díky jeho nízkému pH (střední hodnota pH žaludku je 1,4), tak se zde nachází pouze 10^2 - 10^4 CFU/ml (Ianiro *et al.*, 2015). Žaludek společně s jícnem a dvanáctníkem tenkého střeva jsou nejméně kolonizované oblasti GI traktu, a proto u nich narůstá zájem jakou roli hrají bakterie ve zdraví a v nemoci (Hunt *et al.*, 2015). *H. pylori* je bakterie čistě přizpůsobená lidskému hostiteli, a to vedlo ke koevoluci. *H. pylori* řadíme mezi patobionty, tento pojem specifikuje bakterie s komenzálním a patogenním životním stylem, který není určen výhradně bakteriálními rysy, ale i hostitelem či faktory prostředí. Proto může *H. pylori* způsobovat těžké infekce, které mohou vést až k chronickým gastritidám, vředům, adenokarcinomu žaludku nebo k MALT lymfomu. Na druhou stranu některé infekce mohou být pro člověka i výhodné, například po infekci v raném období se značně snižuje riziko astmatu nebo celiakie později v životě (Gorkiewicz, Moschen, 2018).

Složení esofageálního mikrobiomu je silně ovlivněno mikroorganismy, které pocházejí z ústní dutiny. Zde především dominují rody jako jsou *Streptococcus*, následované *Prevotella*, *Veillonella* a *Fusobacterium*, které představují zdravý mikrobiom jícnu (Gorkiewicz, Moschen, 2018). První studie, které se začaly věnovat esofageálnímu mikrobiomu se datují od počátku 80. let, byly založeny na kulturních metodách a prokázaly, že jícen nebyl sterilním místem a neobsahoval pouze přechodné mikroorganismy pocházející jak z ústní dutiny polykáním nebo ze žaludku pomocí gastroezofágového refluxu (Di Pilato *et al.*, 2016). Při dlouhodobém vystavení distálního jícne žaludečním kyselinám a žlučovým solím duodena je považováno za hlavní faktor, který je základem patogeneze pro gastroezofageální reflux, Barrettův jícen až dokonce adenokarcinomy gastroezofageální junkce (Gorkiewicz, Moschen, 2018).

Tenké střevo oproti tlustému střevu je méně zastoupeno, odhaduje se, že se zde nachází 10^2 - 10^7 CFU/ml. Toto relativně malé množství je způsobeno rychlým luminálním tokem a sekrecí baktericidních látek jako jsou žlučové kyseliny v této části GI traktu. Zastoupení mikroorganismů v tenkém střevě výrazně kolísá. Ke kolísání dochází během několika dnů, ba dokonce i během jednoho dne, to vše se pravděpodobně odráží na stravování jednotlivců. Mikrobiom může zahrnovat rodově specifické druhy jako jsou *Clostridium*, *Escherichia* a *Turicibacter* v různých množstvích, ale trvale se zde setkáváme s rody *Streptococcus* a *Veillonella* (Aidy *et al.*, 2015).

Bakterie v lidském mikrobiomu lze v současné době klasifikovat do 29 fyl a 5569 taxonů, a to podle: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). Ve střevě převládají nejvíce tři hlavní fyly: *Firmicutes* (například třídy *Bacilli* a *Clostridia*), *Bacteroidetes* (například třídy *Bacteroidia*, *Flavobacteria* a *Sphingobacteria*) a *Proteobacteria* (do této fyly patří mnoho patogenních rodů jako jsou *Escherichia* či *Salmonella*), a méně hojně se zde ještě vyskytují *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*) (Dugas *et al.*, 2018).

Zastoupení různých kmenů mikroorganismů v GI soustavě, včetně jejich lokace můžeme vidět na následujícím obrázku č.1.



Obrázek 1: Zastoupení mikroorganismů v gastrointestinální soustavě (Yadav *et al.*, 2018)

Dysbióza ve střevní mikroflóře nastává, když dojde k porušení rovnováhy mezi komenzálními a patogenními bakteriemi a dále dochází k produkci mikrobiálních antigenů a metabolitů. V současné době je již známo, že produkty odvozené právě ze střevní mikroflóry indukují zánětlivou aktivaci tkáňově rezidentních makrofágů a přispívají k metabolickým a degenerativním chorobám jako jsou diabetes, obezita, metabolický syndrom a rakovina (Belizário *et al.*, 2018).

1.1.1.1 Fekální mikrobiální transplantace

Při dlouhodobém vystavování těla vysokým dávkám antibiotik dochází k permanentní změně střevní mikrobiální komunity. Například antibiotikum vankomycin, které je zejména proti anaerobům, může narušit a destabilizovat střevní mikrobiom nebo širokospektrá antibiotika mohou způsobovat přemnožení *Clostridium difficile* či chronickou recidivující kolitidu. K obnovení střevní mikrobioty se po kolorektálních infekcí způsobené právě *Clostridium difficile* využívá procedury fekální bakterioterapie. Ta funguje na základě transplantace kapalné suspenze stolice od lidského dárce (dárce je člověk bez onemocnění po předchozím screeningu, ale také to může být i člen rodiny), která se inokuluje do střev pacienta. Tato suspenze obsahuje 3 až 10 % živých bakterií, mrtvé bakterie, buňky tlustého střeva a dalších složek, které mají vliv na výsledky transplantace. Blahodárné účinky této terapie vyplynuly z provedených studií, kde pacienti, kteří byli léčeni právě fekální mikrobiální transplantací byli přibližně až z 90 % vyléčeni, oproti 31 % vyléčených pacientů, kteří dostávali pouze vankomycin (Belizário *et al.*, 2018).

1.1.1.2 Probiotika, prebiotika a synbiotika

Znovu k nastolení rovnováhy ve střevech napomáhají probiotika, prebiotika či synbiotika. Probiotika jsou definovaná podle současné definice, kterou zveřejnili v roce 2002 odborníci ze skupin FAO a WHO jako živé kmeny přísně vybraných mikroorganismů, které když jsou podávány v odpovídajícím množství a mají pro hostitele příznivé zdravotní účinky. Prebiotika byla poprvé definovaná v roce 1995 a to vědci Gibsonem a Roberfroidem. Definovali prebiotika jako nestravitelné potravinové složky, které stimulují růst anebo aktivitu jediného typu, případně limitovaného množství žijících mikroorganismů v GI traktu, a tím zlepšují zdravotní stav hostitele. Synbiotika byla vytvořená kombinací obou složek, jak probiotické, tak i prebiotické (Markowiak, Śliżewska, 2017).

V následující tabulce 1 jsou znázorněny probiotické mikroorganismy, které se používají ve výživě lidí, dále příklady prebiotik a synbiotik.

Tabulka 1: Probiotika, prebiotika a synbiotika (Markowiak, Śliżewska, 2017).

PROBIOTIKA		
Rod <i>Lactobacillus</i>	Rod <i>Bifidobacterium</i>	Ostatní bakterie mléčného kvašení
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. helveticus</i>	<i>B. infantis</i>	Ostatní mikroorganismy
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. pentosus</i>		<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. plantarum</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
PREBIOTIKA		SYNBIOTIKA
Fruktooligosacharidy (FOS)		r. <i>Lactobacillus</i> + inulin
Galaktooligosacharidy		r. <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> + FOS
Transgalaktooligosacharidy		r. <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Enterococcus</i> + FOS
Xylooligosacharidy		r. <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> + oligofruktóza
Lacticol		r. <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> + inulin
Laktosukóza		
Laktulóza		
Inulin		

1.1.2 Mikrobiom kožní soustavy

Lidská kůže je osídlena miliony druhů bakterií, hub či virů a tím tvoří mikrobiom kůže. I zde mikroorganismy zastávají důležitou roli v ochraně proti patogenům, vzdělávání imunitního systému či rozkladu přírodních produktů. Lidská pokožka je největším orgánem těla a je převážně kolonizována prospěšnými mikroorganismy. Tyto mikroorganismy slouží jako fyzická bariéra a snaží se co nejvíce znemožnit invazi patogenů. Nicméně při narušení této bariéry nebo rozvrácení rovnováhy mezi komenzály a patogeny, může nastat onemocnění kůže a v horších případech může dojít až k systémovým onemocněním (Byrd *et al.*, 2018).

Na kůži je mnoho míst, na kterých se nachází rozsáhlé populace mikrobů, tato místa jsou vystavena různým ekologickým tlakům včetně vlhkosti, teploty, pH a složení antimikrobiálních peptidů a lipidu. Dále pokožka obsahuje kožní struktury jako jsou vlasové

folikuly, mazové, potní či apokrinální žlázy, na nich můžeme nalézt jedinečnou mikrobiotu. Součástí mikrobiomu kůže je alespoň devatenáct fyl, mezi hlavní patří například *Actinobacteria* (51,8 %), *Firmicutes* (24,4 %), *Proteobacteria* (16,5 %) a *Bacteroidetes* (6,3 %) (Schommer, Gallo, 2013).

Zastoupení jednotlivých skupin je silně závislé na vlastnostech příslušného místa. V mazových oblastech na obličeji či trupu převládají především rody *Cutibacterium* (dříve známý jako *Propionibacterium*) a *Staphylococcus*. Na vlhkých místech jako jsou například podpažní jamky, ohyb lokte či kolena převládají druhy *Corynebacterium*, nicméně může zde být i výskyt *Staphylococcus*. Dále můžeme klasifikovat výskyt na suchých místech, kde jsou smíšené bakteriální populace β -*proteobacteria* a *Flavobacteriales*, které jsou součástí rezidentní mikrobioty (Schommer, Gallo, 2013). Na druhou stranu fungální zastoupení od bakteriálních komunit je podobné napříč celým tělem bez ohledu na fyziologii. Nicméně například houby z rodu *Malassezia* dominují na těle a rukou, kdežto místa na nohou byla kolonizována různorodější kombinací druhů *Malassezia*, *Aspergillus*, *Cryptococcus spp*, *Rhodotorula spp*, *Epicoccum spp* a další (Byrd *et al.*, 2018).

Chemické složení jednotlivých kožních záhybů jako jsou lipidy, antimikrobiální peptidy, enzymy, soli či mnoho dalších sloučenin řídí mikrobiální složení tohoto prostředí. Nicméně neznámé mikrobiální a hostitelské faktory přispívají k důležitým rozdílům ve složení na úrovni druhů a kmenů. Například u některých druhů, jako je *Cutibacterium acnes* má tentýž kmen tendenci kolonizovat více míst na těle stejného jedince, na druhou stranu jsou také kmeny jako je *Staphylococcus epidermidis*, který je na různých místech jedince odlišný (Chen *et al.*, 2018).

První známky osidlování kůže mikroby jsou již během porodu a postup trvání je až několik týdnů. Nicméně počáteční kolonizace kůže je závislá na způsobu porodu. Například jedinci, kteří jsou narození vaginálně získávají bakterie, které kolonizují vagínu, naopak jedinci narození císařským řezem získávají mikroorganismy spojené s kůží (Byrd *et al.*, 2018). Změna nastává zejména v období puberty, kde převažují rody *Corynebacterium*, *Cutibacterium* a fungální *Malassezia spp* a naopak dochází ke snížení výskytu rodu *Firmicutes*, včetně druhů *Staphylococcus* a *Streptococcus*. Toto mikrobiální složení zůstává nadále i v dospělosti neměnné, a to i navzdory neustálého působení životního prostředí na pokožku. Díky tomu je známo, že mezi komenzálními mikroby a mezi mikroby a hostitelem existují neustálé

vzájemně prospěšné interakce (Chen *et al.*, 2018). Nicméně i zde dochází k porušení homeostáze mezi mikrobiomem a hostitelem, což může vést k různým kožním onemocněním jako je akné, atopická dermatitida, psoriáza, rosacea či seboroická dermatitida (Schommer, Gallo, 2013).

1.1.3 Mikrobiom dutiny ústní

Mikrobiom ústní dutiny byl poprvé rozpoznán holandským vědcem Antonym van Leeuwenhoekem a to již v roce 1676 za pomoci mikroskopu jeho vlastní výroby. Dalším důležitým mezníkem byl rok 1924, kdy byl poprvé izolován *Streptococcus mutans* ze zdravé ústní dutiny vědcem J. Killianem Clarkem. Místa, která jsou bakteriemi v ústní dutině kolonizována zahrnují tvrdé a měkké patro, sub/supragingivální zubní plak, zuby, rty, tváře a krční mandle (Verma *et al.*, 2018)

Mikrobiom ústní dutiny hraje zásadní roli při udržování normálního fyziologického prostředí v ústech. Právě při dysbióze dochází k narušení obranných mechanismů hostitele, které mohou mít za následek chronické periodontální onemocnění až ztrátu zubu. Dále některé chronické bakteriální infekce mohou být také promotory případně i samotné příčiny rakoviny úst. Do dnešních dnů je odhadováno, že ústní dutinu tvoří více než 700 mikrobiálních druhů včetně komenzálních a oportunistických bakterií, hub či virů. Tyto mikroorganismy žijí mezi sebou a také hostitelským imunitním systémem v symbióze (Gholizadeh *et al.*, 2016). Na základě různých analýz vědci odhadují dominanci těchto druhů *Firmicutes* (36,7 %), *Bacteroidetes* (17,7 %), *Proteobacteria* (17,1 %), *Actinobacteria* (11,6 %), *Spirochaetes* (7,9 %) a *Fusobacteria* (5,2 %). Dále je zde přítomno více než 100 druhů hub, kde nejčastěji k tvorbě biofilmů přispívají *Candida spp* (Verma *et al.*, 2018).

Orální mikrobiom se jako ostatní též během života mění, a to již od počáteční kolonizace při porodu až po stáří (Krishnan *et al.*, 2017). Tyto prvotní bakterie novorozenci získávají z porodního kanálu, později z mateřského mléka a úst matky, jedná se především o laktobacily, bifidobakterie a streptokoky. Tyto bakterie jsou povzbuzovány k růstu složkami, které jsou obsáhlé v mateřském mléce. A právě díky tomu, jak je novorozenec stravován, buď to kojením, nebo kojeneckými přípravky, má svůj vliv na vývoj mikrobiomu (Kilian, 2018). Metabolismus a růst těchto prvotních bakterií mají za následek změny lokálních enviromentálních podmínek

jako je redoxní potenciál, pH, koagregace a dostupnost živin, tyto změny umožňují kolonizaci dalších a více náročných bakterií (Krishnan *et al.*, 2017).

1.2 Testované mikroorganismy

1.2.1 Bakterie

1.2.1.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli se řadí do bakteriální rodiny *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní koliformní bakterii, jež má fakultativně anaerobní povahu. V mikroskopu jí pozorujeme pod tyčinkovitým tvarem, buďto jednotlivě, ve dvojici nebo také v krátkých řetzcích, dále netvoří spory a pomocí bičíků je schopná pohybu. Většina kmenů *E. coli* osidluje GI trakt lidí a teplokrevných zvířat, kde buď prospívá, tím že brání kolonizaci patogenních bakterií, nebo je sama zodpovědná za rozvoj různých onemocnění (Sharma *et al.*, 2016). *E. coli* mají specializované virulentní faktory jako jsou adheziny, toxiny, systémy pro získávání železa, polysacharidová pouzdra a invaziny, které nejsou přítomné v komenzálních či u střevních patogenních kmenů (Vila *et al.*, 2016).

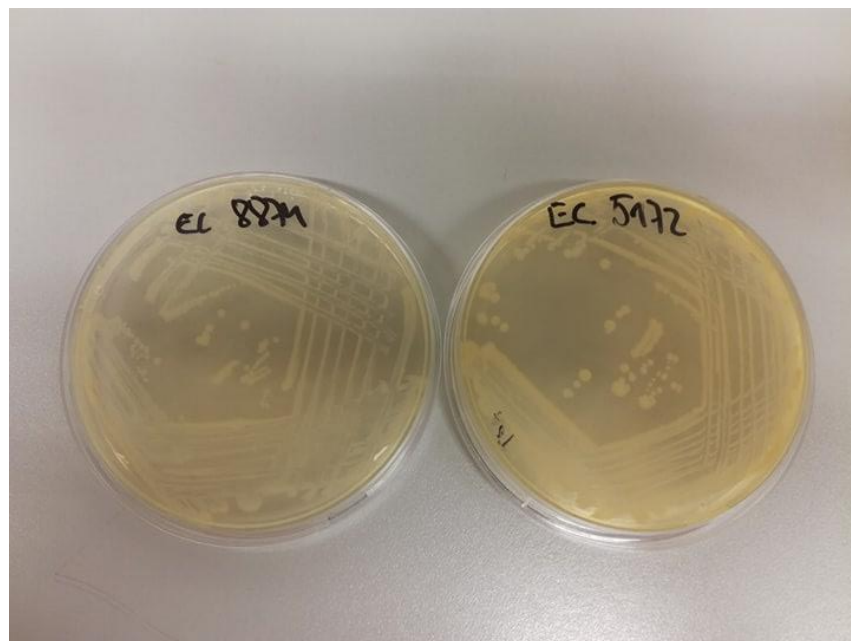
Poprvé byla tato bakterie objevená německým pediatrem Theodorem Escherichem ve stolici dítěte trpícím průjmem, a to již v roce 1885. Později v roce 1893 dánský veterinář usuzoval, že druh *E. coli* zahrnuje více kmenů, z nichž některé jsou patogenní a jiné zase ne. Toto tvrzení se později potvrdilo a *E. coli* se nyní klasifikuje na několik patogenních kmenů, které způsobují různé střevní, močové nebo jiné vnitřní infekce (Mainil, 2013).

Pro rozlišování různých kmenů *E. coli* se používá sérotypizace podle Kauffmannova schématu, tj. identifikace somatických (O antigenů), kapsulárních (K antigenů) a bičíkových (H antigenů) povrchových antigenů. Pro tuto identifikaci bylo navrženo více než 180 O antigenů, 60 H antigenů a 80 K antigenů. Každý O antigen definuje séroskupinu, a specifické kombinace O a H antigenů definuje sérotyp izolátu. Právě jeden patotyp může zahrnovat několik séroskupin a též jedna séroskupina může patřit k několika patotypům, ba dokonce i k nepatogenní *E. coli* (Stenutz *et al.*, 2006).

E. coli je jeden z nejvíce rozmanitých bakteriálních druhů, který můžeme rozdělit na tři hlavní podmnožiny. Jako první to jsou komenzální kmeny, které neškodně kolonizují tlusté střevo zdravého jedince. Nicméně při přemnožení mohou i tyto kmeny způsobovat onemocnění

zažívacího traktu. Druhou podmnožinu tvoří diarhogenní kmeny, jež způsobují průjemové syndromy. Tyto syndromy se od sebe liší klinicky, ale také patogenezí podle charakteristických virulentních vlastností jednotlivých kmenů. Tuto podmnožinu tedy můžeme dále rozdělit na další subpatotypy, mezi které patří například: Enterohemoragické *E. coli* (EHEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC) a enteroinvazivní *E. coli* (EIEC). Poslední podmnožinu tvoří extraintestinální patogenní *E. coli* (ExPEC), ty jako komenzální bakterie můžeme často nalézt v tlustém střevě. Nicméně tyto kmeny mají jedinečnou schopnost přežít i na sterilních místech mimo zažívací trakt a tam způsobovat onemocnění, jedná se především o uropatogenní *E. coli* (UPEC) (Vila *et al.*, 2016). Dále jsou ExPEC často spojovány s nozokomiálními a komunitními infekcemi (Allocati *et al.*, 2013)

E. coli je též přítomná v seznamu Centers for Disease Control and Prevention (CDC) biologických původců, kteří mohou být využity jako biologická zbraň, a díky tomu se můžou stát hrozbou pro veřejné zdraví a bezpečnost. CDC klasifikuje tyto agens do 3 kategorií. V kategorii A jsou uvedeny agens, které lze velmi snadno šířit (např. z člověka na člověka) a to má za následek vysokou úmrtnost. V kategorii B, kam patří i *E. coli*, jsou patogeny, které se dobře šíří, a to má za následek mírnou míru morbidit a nízkou úmrtnost. Do poslední kategorie C se řadí nově se objevující patogeny s potenciálně vysokou morbiditou a mortalitou, které lze snadno rozšířit (Allocati *et al.*, 2013).



Obrázek 2: *Escherichia coli* CCM 8874 a CCM 5172 na TSA

1.2.1.1.1 Enterohemoragické *E. coli* (EHEC)

Do EHEC řadíme *E. coli*, které nesou Stx gen (Stx1 a Stx2) k produkci Shiga toxinů, tyto bakterie jsou definovány jako Shiga-like toxigenní *E. coli* (STEC), nebo jsou též známé jako verotoxigenní *E. coli* (VTEC) (Yang *et al.*, 2017). Přežívání a virulence EHEC v GI traktu, stejně jako interakce střevního epitelu, jsou klíčovými znaky bakteriální patogeneze, ale zůstávají z velké části neznámé. Nicméně je dobře zdokumentováno, že několik patogenních mikroorganismů používá M-buňky a Peyeroovy pláty k napadení hostitelské střevní sliznice (Cordonnier *et al.*, 2017).

K přenosu STEC dochází především kontaminovanou potravou a vodou nebo při kontaktu s infikovanými zvířaty. Je možný i přenos z člověka na člověka, a to blízkým kontaktem, například v rodině či ve školách. K vyvolání infekce u člověka je potřebný nízký počet STEC, stačí i méně než 1000 bakterií. Mezi příznaky se řadí vodnatý průjem, horečka, křeče v břiše, zvracení, hemoragická kolitida, ve vážnějších případech i hemolytický uremický syndrom či smrt. Léčba probíhá rehydratací organismu, ale mohou být také použity antibiotické přípravky (Yang *et al.*, 2017).

1.2.1.1.2 Enterotoxigenní *E. coli* (ETEC)

ETEC je jednou z nejdůležitějších příčin bakteriálních průjmů v rozvojových zemích, je také spojována s vysokou úmrtností dětí do 5 let a je velmi častou příčinou průjmů u turistů, kteří cestovali do Afriky, Asie nebo Latinské Ameriky (Mirhoseini *et al.*, 2018). ETEC produkují dva typy virulenčních faktorů. Prvním jsou adheziny, které podporují vazbu a kolonizaci střevního epitelu a druhým je produkce enterotoxinů. Je rozpoznán tepelně stabilní enterotoxin (ST) a tepelně labilní enterotoxin (LT), který je podobný cholera toxinu (Dubreuil, 2017).

K přenosu infekce ETEC dochází opět kontaminovanou potravou či vodou, ale nedochází k přenosu z člověka na člověka. Infekční dávka pro dospělé se odhaduje na 10^8 mikroorganismů, nicméně pro starší osoby a děti stačí ještě nižší počet. Mezi typické klinické příznaky patří vodnatý průjem, bolesti břicha, nevolnosti, zvracení a horečky. Tyto příznaky trvají po dobu 3 až 5 dnů a léčba je opět rehydratací organismu nebo antibiotiky (Yang *et al.*, 2017).

1.2.1.1.3 Enteropatogenní *E. coli* (EPEC)

EPEC byl vůbec první popsáný typ *E. coli*. Jeho prvotní výskyt byl v roce 1945 ve Velké Británii a nalézal se u kojenců trpícím průjmem. Nyní je EPEC vysoce rozšířený v komunitním prostředí, například ve školách či nemocnicích, a je také hlavní příčinou přetrvávajícího průjmu. Touto bakterií se mohou nakazit lidé, ale i zvířata. Typickými příznaky jsou vodnatý průjem, bolesti břicha, nevolnost, zvracení a horečka. Stejně jako u ETEC je zde infekční dávka pro zdravé osoby odhadnuta na 10^8 mikroorganismů. I tady léčba probíhá pomocí zavodnění organismu a při dlouhodobé infekci se doporučují antibiotika (Yang *et al.*, 2017).

EPEC se dělí do dvou skupin – typické EPEC a atypické EPEC. V minulosti byla diagnostika EPEC založena pouze na identifikaci sérotypu O:H, nyní se ale také zvažují fenotypy a genotypy EPEC. Dále je EPEC dobře rozpoznatelná histopatologicky díky tomu, že je schopná vytvářet A/E léze na povrchu střevních epiteliálních buněk (Yang *et al.*, 2017).

1.2.1.1.4 Enteroagregativní *E. coli* (EAEC)

EAEC bývá spojován s chronickým průjmovým onemocněním převážně v rozvojových zemích, ale také se nachází i u imunokompromitovaných osob, například osoby nakažené HIV. Poprvé byl tento typ definován v roce 1987, jako typ, který je schopen přilnout k HEp-2 buňkám (Stenutz *et al.*, 2006).

Napadnutí organismu EAEC lze shrnout do tří kroků. Prvním krokem je přilnutí k povrchu střevní sliznice pomocí fimbrií agregativní adherence. Následně na tomto povrchu dochází k vytváření biofilmu, o který se postaral hlen. A v neposlední řadě EAEC uvolňuje toxiny, který mají za následek zánět, střevní sekreci a mukózní toxicitu (Yang *et al.*, 2017).

Mezi typické příznaky infekce vyvolané EAEC řadíme vodnatý průjem, ve kterém se nachází hlen, dále je infekce doprovázená horečkou, zvracením a břišními bolestmi. Jako přechodný typ, i tento je léčen rehydratací organismu a antibiotickou podporou, nicméně se odolnost EAEC proti antibiotikům celosvětově zvyšuje (Yang *et al.*, 2017).

1.2.1.1.5 Enteroinvazivní *E. coli* (EIEC)

EIEC je původcem bacilární úplavice u lidí převážně v rozvojových zemích. Tento typ je velmi úzce spjatý s kmenem *Shigella spp.* a v současné době se předpokládá,

že se *Shigella* vyvinula právě z EIEC (Yang *et al.*, 2017). Tyto dva druhy bakterií mají velmi podobné biochemické, genetické a patogenní vlastnosti, tento fakt může tedy zkomplikovat jejich správnou identifikaci. Jimi způsobená průjmová onemocnění pracují na bázi napadení a proniknutí bakterií do enterocytů tlustého střeva, což má za následek jejich destrukci (Gomes *et al.*, 2016).

Bakterie potřebné k vyvolání infekce EIEC u zdravého člověka je zhruba 10^6 - 10^{10} , což je oproti vysoce virulentní *Shigella*, která vyvolává onemocnění již při množství 10 až 100 agens velmi razantní rozdíl. Symptomy obou druhů mohou sahát od mírného vodnatého průjmu až po těžkou bacilární úplavici, která je charakterizována křečí v břiše, horečkami, zimnicí a nálezem krve a hlenu ve stolici. Mohou nastat i závažné život ohrožující komplikace jako jsou megakolon, perforace střev, peritonitida, pneumonie či hemolytický uremický syndrom (Yang *et al.*, 2017).

1.2.1.1.6 Extraintestinální patogenní *E. coli* (ExPEC),

Typ ExPEC způsobuje onemocnění mimo GI trakt. Nejvíce se vyskytují v močovém traktu, ale může infikovat jakékoliv extraintestinální místo například v centrálním nervovém systému, v krevním řečišti nebo v respiračním systému (Vila *et al.*, 2016). Nejdůležitějšími odlišujícími znaky ExPEC od komenzálních a enterických *E. coli* jsou faktory virulence, jež jsou schopné umožnit jejich úspěšnou kolonizaci. Infekce, které způsobuje ExPEC jsou zaznamenány u všech věkových kategorií lidí, ale i zvířat. U novorozenců je tento typ hlavní příčinou meningitidy, vznikající neurologické léze vedou ke smrti 20 až 40 % infikovaných novorozenců. Dále u dospělých jsou ExPEC nejčastější příčinou infekcí močových cest. Důsledkem těchto infekcí na kterémkoliv místě vzniká bakteriémie (Wasiński, 2019)

1.2.1.2 *Enterococcus hirae* (*E. hirae*)

Enterokoky spadají mezi grampozitivní bakterie, jejich výskyt je všudypřítomný, nacházejí se v půdě, povrchových či mořských vodách, dále jsou přítomné také ve fermentovaných potravinářských výrobcích, a především jsou součástí střevní mikrobioty a mohou být původci některých lidských chorob. Při pozorování mikroskopem se nám tvarově jeví jako vajíčkovité bakterie, které se vyskytují jednotlivě, ve dvojici, v řetězci nebo jako více početná skupina. Jsou to chemoorganotrofní fakultativně anaerobní bakterie, které netvoří spory (García-Solache, Rice, 2019)

E. hirae se spolu s *E. durans* a *E. mundtii* řadí do skupiny enterokoků - *E. faecium* (García-Solache, Rice, 2019). *E. hirae* je u lidí zřídka identifikován, proto jsou údaje o prevalenci omezené, nicméně se odhaduje, že *E. hirae* může představovat 0,4 – 3,03 % všech enterokokových infekcí, ale kvůli jeho vzácnosti mohou být nedostatečně diagnostikovány (Pinkes *et al.*, 2019). Mezi infekce způsobené tímto mikroorganismem můžeme zahrnout endokarditidu, akutní pankreatitidu, pyelonefritidu a septický šok (Lodovico *et al.*, 2017).



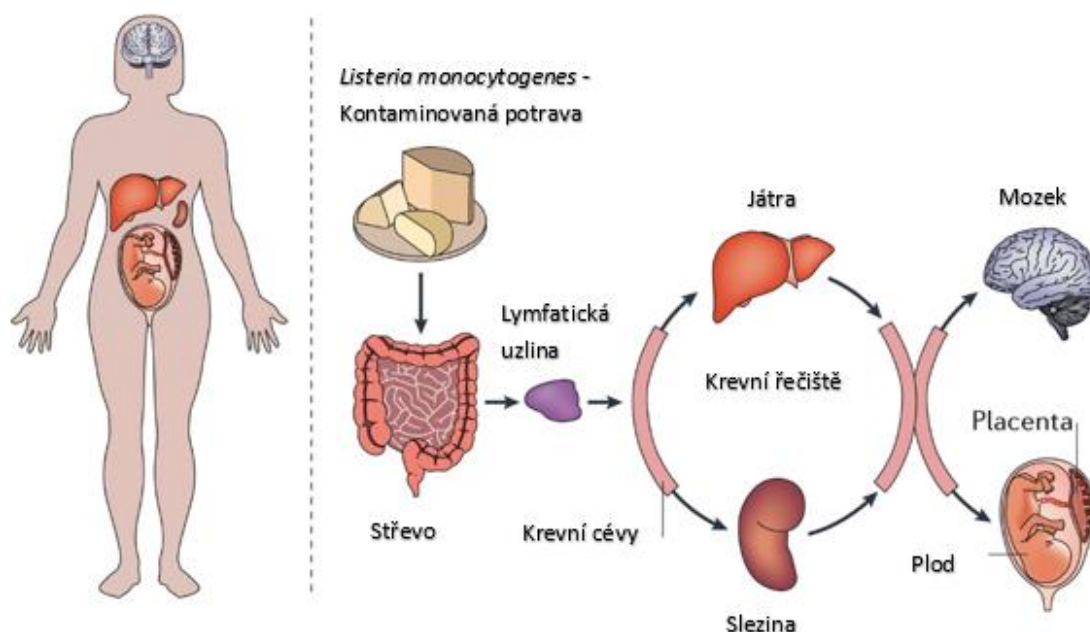
Obrázek 3: Kolonie *Enterococcus hirae* na KA (Oh *et al.*, 2019)

1.2.1.3 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)

L. monocytogenes je všudypřítomná grampozitivní fakultativně anaerobní intracelulární bakterie, tyčinkovitého tvaru se zaoblenými konci. Netvoří spory a je schopná pohybu pomocí 1 až 4 bičíků. Poprvé byla popsána roku 1926 během vypuknutí epidemie, která postihovala králíky a morčata. Nicméně v 70. letech minulého století byla *L. monocytogenes* uznána jako etiologický původce lidské choroby a v další dekádě byla identifikována jako potravou přenášený patogen (Radoshevich, Cossart, 2018).

L. monocytogenes jakožto intracelulární patogenní bakterie musí při infekci hostitelského organismu pronikat nejen střevními buňkami, ale také buňkami sleziny, jater, mozku, srdce či placenty (Chlebicz, Śliżewska, 2018). *L. monocytogenes* je schopná sama sebe internalizovat pomocí nefagocytárních buněk, což jí umožňuje překonat důležité patofyziologické bariéry, dokáže přežít a následně proliferovat uvnitř hostitelských imunitních fagocytárních buněk. Pro ještě lepší infikování buněk využívá *L. monocytogenes* velké množství faktorů virulence, které působí v jednom nebo ve více krocích cyklu buněčné infekce.

Většina těchto faktorů obsahuje proteiny, které se nalézají na povrchu bakteriálních buněk. Takto umístěné proteiny jsou poté schopny přímo interagovat s hostitelskými buňkami a tím docílit vyvolání účinků, které jsou nevyhnutelné k propuknutí infekce (Carvalho *et al.*, 2014).



Obrázek 4: Schéma infekce *Listeria monocytogenes* (Radoshevich, Cossart, 2018)

1.2.1.3.1 Listerióza

L. monocytogenes je nositelem oportunního a invazivního onemocnění listerióza. Onemocnění se vyskytuje především u imunokompromitovaných osob, jako jsou HIV pacienti, starší osoby, kojenci nebo těhotné ženy. Je spojena s vážnějšími klinickými příznaky včetně septikémie, encefalitidy, meningitidami, bakteriemiemi u těchto oslabených jedinců a spontánními potraty těhotných žen (Nyarko, Donnelly, 2015).

Listerióza je přenášena především konzumací kontaminovaných potravin, jako je maso (klobásy, paštiky, šunky, salámy a kuře), zelenina, mořské plody (uzené ryby nebo mušle), nepasterizované mléko, zmrzlinou či sýry. Její schopnost přežití a růstu v drsných podmínkách, jako je široké pH rozmezí, vysoké koncentrace soli či nízké teploty mezi -2 až -42 °C, z ní činí velký problém v potravinářském průmyslu. Nicméně až 10 % populace jsou fekálními nosiči této bakterie (Hernandez-Milian, Payeras-Cifre, 2014).

Inkubační doba listeriózy je proměnlivá a dlouhá, pohybuje se od 1 až do 70 dní. Dle různých provedených klinických studií bylo zjištěno, že například případy související s těhotenstvím mají delší inkubační dobu (medián 27,5 dne, v rozmezí od 17 do 67 dní) oproti případům centrálního nervového systému (zde byl medián 9 dní, v rozmezí od 1 do 14 dnů) nebo bakteriemiemi (medián 48 h, v rozmezí 1 až 12 dní) (Hernandez-Milian, Payeras-Cifre, 2014). Infekční dávka není definovaná, protože je závislá na citlivosti hostitelského organismu a virulenci konkrétního kmene. Přesto bylo dohodnuto, že k vyvolání infekce stačí 10^6 CFU/g (Chlebicz, Śliżewska, 2018).

U zdravých jedinců probíhá infekce *L. monocytogenes* bez symptomů, nebo může vyvolávat bolesti kloubů, hlavy a žaludku, průjemy, nevolnosti, nechutenství a únavu. Tyto symptomy většinou do 3 dnů odezní. U těhotných žen může být infekce až fatální pro plod. U novorozenců může docházet k sepsi, pneumonii či meningitidě. Listerióza nepatří mezi běžná onemocnění, ale většina případů je spojena s nutnou hospitalizací. Dále je toto onemocnění spojeno s vysokou úmrtností a pohybuje se od 20 do 30 %, avšak u pacientů v rizikové skupině je tato hodnota až 75 % (Chlebicz, Śliżewska, 2018). Léčba je prostřednictvím antibiotik, u bakteriémie je důležité s ní co nejrychleji začít vzhledem k závažnosti onemocnění. První volbou jsou β -laktamová antibiotika, obvykle se jedná o ampicilin. Obvyklá doba léčby jsou asi dva týdny (Hernandez-Milian, Payeras-Cifre, 2014).

1.2.1.4 *Proteus spp.*

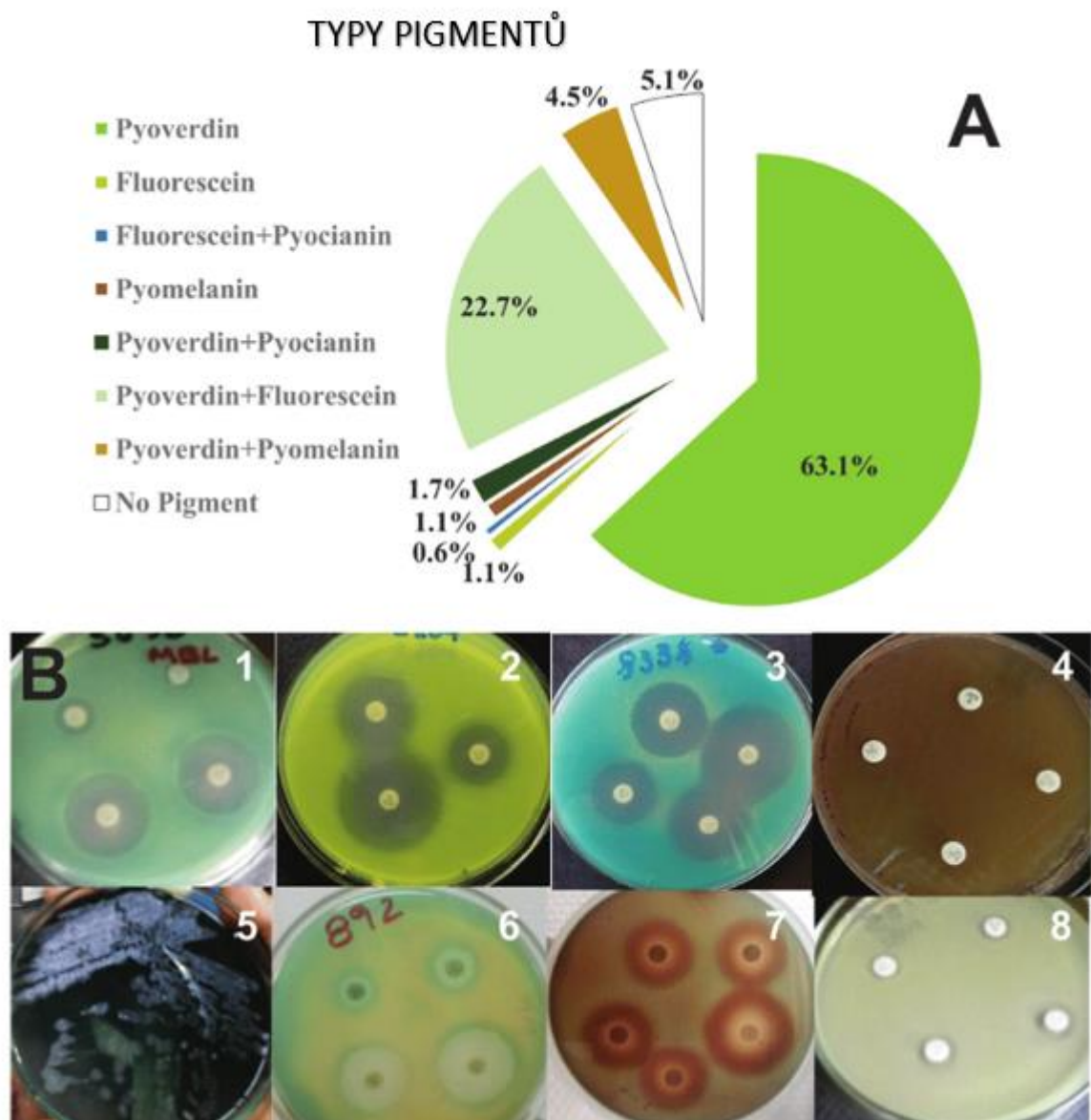
Proteus spp. se řadí do gramnegativních bakterií patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o fakultativně anaerobní, heterotrofní a proteolytické tyčinky, které jsou lidskými oportunními patogeny. Poprvé byly pospány v roce 1885 německým mikrobiologem Gustavem Hauserem, jednalo se o dva druhy tohoto rodu - *P. mirabilis* (typický plazivý růst) a *P. vulgaris*. Nejčastěji jsou rozpoznány jako příčiny infekcí močových cest, ale také se vyskytují jako běžné komenzály střevního mikrobiomu, nicméně jejich hojnost je velmi nízká, odhaduje se, že tvoří méně než 0,05 % mikrobiální komunity (Hamilton *et al.*, 2018).

Druhy *Proteus* mají mnoho virulentních faktorů, které jsou významné pro GI patogenitu. Jedná se o pohyblivost, schopnost adherence, produkce ureázy, hemolyzinů a IgA proteáz a v neposlední řadě schopnost získat rezistence na antibiotika. GI stavy spojené s těmito druhy zahrnují gastroenteritidu (jak spontánní, tak i potravinovou), nozokomiální infekce

a apendicitidou. V posledních letech je velice spojován s Crohnovou chorobou jako potenciální patogen po střevní resekci (Hamilton *et al.*, 2018).

1.2.1.5 *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)

P. aeruginosa je gramnegativní bakterií a patří do čeledi *Pseudomonadaceae*. Netvoří spory a je striktně aerobní. Má tyčinkovitý tvar, dále je pohyblivá a můžeme jí pozorovat na různých biotických a abiotických místech. Poprvé byla popsána v roce 1862 Lukem, který pozoroval tyčinkovité částice v modrozeleném hnisu z lidské infekce. Nyní je známo, že toto zbarvení je způsobené pigmentovým pyocyaninem produkovaným právě *P. aeruginosa* (Al-Wrafiy *et al.*, 2017).



Obrázek 5: Relativní četnost typů pigmentů produkovaných kmeny *P. aeruginosa* (Rodulfo *et al.*, 2019)

P. aeruginosa vlastní jediný polární bičík, který má důležitou roli v pohyblivosti, je nezbytnou součástí chemotaxe, vyvolává zánět a může zprostředkovat počáteční povrchové interakce s asialylovaným glykolipidem. Dále se u této bakterie vyskytují pilusy IV typu, které slouží k přilnutí na buněčné membrány a jiné povrchy (Al-Wrafiy *et al.*, 2017). Mimo tyto zmíněné virulentní faktory může *P. aeruginosa* využívat k poškozování epitelových buněk ještě enzymy (proteázy a elastázy), různé toxiny (exotoxin A a exotoxin S), adheziny a systémy pro sekreci proteinů (Markou, Apidianakis, 2014)

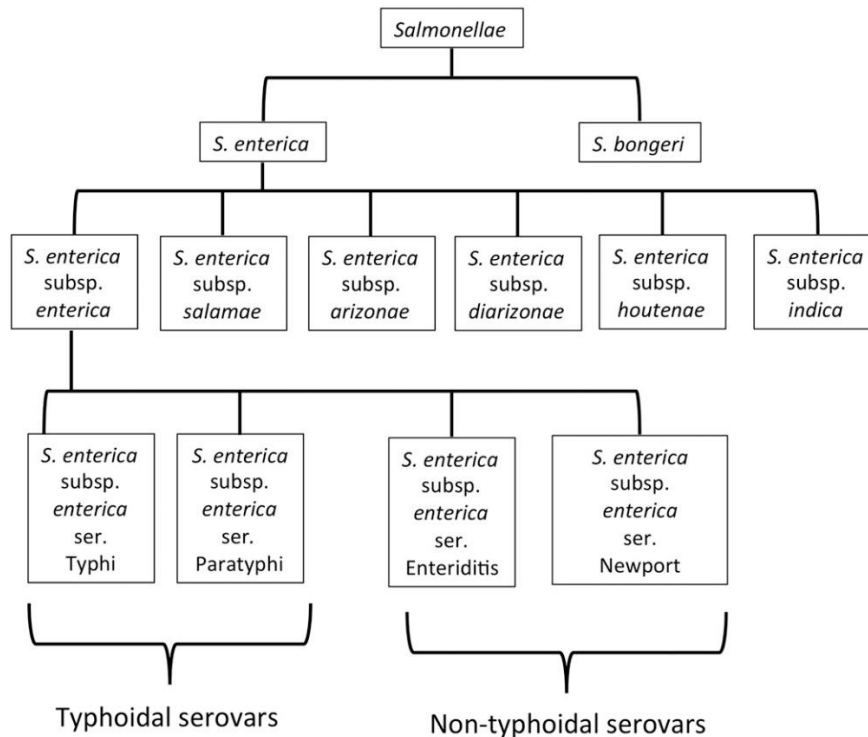
P. aeruginosa si postupem času vyvinula účinnou antimikrobiální rezistenci, což ztěžuje léčbu, a také omezuje veškeré terapeutické možnosti. Její rezistenci můžeme rozdělit do tří skupin – vnitřní rezistenci, získanou rezistenci a adaptivní rezistenci. Pokud se bude objevovat zároveň, jak vnitřní rezistence, tak i získaná rezistence, pak je velmi obtížné vyléčit jakoukoliv nadcházející infekci. Některé kmeny jsou rezistentní na většinu dostupných antimikrobiálních látek od karbapenemů až po třetí generaci cefalosporinů, které se využívají k léčbě multirezistentních bakterií. (Azam, Khan, 2019)

P. aeruginosa je převládající oportunistický patogen v nemocničním prostředí a je hlavní příčinou akutních nozokomiálních infekcí zejména pneumonií, která má úmrtnost v rozmezí od 13 až do 50 %. V plicích tato bakterie narušuje homeostázi horních a dolních cest dýchacích, a to poškozováním plicního epitele a vyhýbáním se vrozené a adaptivní imunitě hostitele (Curran *et al.*, 2018). Mezi další nemocniční infekce můžeme zařadit infekce krevního řečiště nebo močových cest. Mimo jiné tato bakterie vyvolává také infekce kůže a měkkých tkání, ulcerózní keratitidu a otitis externa. Infekce mohou být spojené i s vysokou mírou morbidity a mortality u imunokompromitovaných jedinců trpících například neutropenií spojenou s chemoterapií, cystickou fibrózou nebo u pacientů s těžkými popáleninami (Markou, Apidianakis, 2014)

1.2.1.6 *Salmonella enterica* (*S. enterica*)

Rod *Salmonella* spadá mezi gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie ze skupiny *Enterobacteriaceae*. Jedná se o tyčinku, která netvoří spory a je schopná pohybu pomocí peritrichálního bičíku. Poprvé byla tato bakterie objevena v roce 1885 veterinářem Salmonem a jeho asistentem Smithem a stala se spolu s *E. coli* z jednou nejstudovanější bakterií. Tento rod se dále dělí do dvou druhů, jsou jimi *S. enterica* a *S. bongori*, ty tvoří dohromady 2579 různých sérotypů. *S. enterica* je dále dělena do 6 poddruhů, nejrozšířenějším poddruhem je

S. enterica subsp. *enterica*, která zahrnuje více než 1500 sérotypů. Nejvýznamnějšími členy této skupiny jsou *S. Typhimurium* a *S. Enteritidis*, kteří jsou nejvíce zodpovědní za propuknutí infekce u lidí (Lamas *et al.*, 2018). Na následujícím obrázku lze vidět rozdělení kmene *Salmonella* na jeho druhy a poddruhy a dále jsou zde znázorněny jen nejběžnější sérovary.



Obrázek 6: Rozdělení kmene *Salmonella* (Deker, Frank, 2015)

Salmonella spp. jsou velmi odolné bakterie, dokážou růst při teplotách mezi 8 a 45 °C, nicméně některé kmeny jsou schopné růstu při vyšších teplotách (54 °C), ale dokonce i při nižších (2-4 °C). Dále jsou schopné růstu v prostředí pH mezi 4 a 9,5 nebo za podmínek nízké aktivity vody (0,94). Virulence je spojována jak s chromozomálními, ale i s plazmidovými geny. V ostrovech patogenity jsou uloženy virulentní geny, více než 60 kódovaných genů je zodpovědných za specifické interakce s hostitelským organismem. Mezi další faktory virulence můžeme zahrnout například tvorbu toxinů (enterotoxin a cytotoxiny) (Chlebicz, Śliżewska, 2018).

Onemocnění vyvolané patogenními bakteriemi u člověka můžeme klasifikovat do tří typů, a to na neinvazivní a netyfoidní, invazivní a netyfoidní a na břišní tyfus způsobený sérotypem *S. typhi* nebo paratyfus způsobený sérotypem *S. paratyphi* A, B a C (Chlebicz, Śliżewska, 2018).

1.2.1.6.1 Neinvazivní, netyfoifní salmonelóza

Do této skupiny se řadí veškerá onemocnění u člověka, která byla vyvolána netyfoidními sérotypy *Salmonella*. Salmonelóza se projevuje akutní enterokolitidou, která může být doprovázená zánětlivými průjmy. K infekci nejčastěji dochází při požití více než 50 000 bakterií v kontaminované potravě či vodě. Inkubační doba je zpravidla od 6 do 72 hodin. Mezi typické příznaky, které se objevují jsou bolesti břicha, průjmy, které mohou mít příměs krve, dále jedinec může trpět nevolností či zvracením. Obvykle tato gastroenteritida vymizí během 5 až 7 dní bez nutnosti léčby. Nicméně při závažných případech je nutná orální či intravenózní rehydratace (Kurtz *et al.*, 2017)

1.2.1.6.2 Invazivní, tyfoidní salmonelóza

Tento typ se vyvinul v subsaharské Africe a má jedinečnou patogenezí. K dnešním dnům jsou tyto kmeny nejčastějšími původci bakteriálních infekcí krevního řečiště izolované od dospělých i dětí právě v této oblasti. Obvykle se tento typ projevuje jako febrilní systémové onemocnění, které není často doprovázeno průjmy. Častý je výskyt onemocnění dolních cest dýchacích. Jeho diagnostika je bez mikrobiologických testů náročná, protože velmi často dochází k překryvu dalšími bakteriálními či parazitárními infekcemi, například pneumonií či malárií. Léčba je prostřednictvím antibiotik, nicméně i tak zůstává velmi vysoká mortalita, která činí od 22 do 47 %. Hlavním rizikovým faktorem pro toto onemocnění je infekce HIV (Kurtz *et al.*, 2017).

1.2.1.6.3 Břišní tyfus

Toto onemocnění je způsobeno sérotypy *S. typhi*. Bakterie se přenáší kontaminovanou vodou a potravou. Dále je přenos ovlivněn přelidněnými oblastmi, kde se nachází velmi špatné hygienické podmínky. Tyto oblasti jsou především Afrika, jihovýchodní a střední Asie. Předpokládá se, že se ročně nakazí až 21 milionů lidí a z toho až 200 000 je fatálních. Jako typické projevy onemocnění se vyznačují bolesti hlavy, žaludku, horečky, průjem či zácpa, dále dochází ke ztrátě chuti k jídlu. Mimo jiné se mohou objevit i jiné příznaky, respirační problémy, smrtelné neurologické změny, perforace střeva či poškození jater a sleziny (Chlebicz, Śliżewska, 2018).

1.2.1.7 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus patří mezi grampozitivní komenzální bakterie a jedná se především o hlavní lidský patogen, který způsobuje širokou škálu klinických infekcí (Tam, Torres, 2019). Poznáme ho podle jeho sférického tvaru, který roste ve shlucích připomínající hrozny (Umerska *et al.*, 2017). Až u 30 % lidské populace dochází k asymptomatické kolonizaci kůže, sliznice a nosních dutin. Nicméně onemocnění způsobené touto bakterií se pohybují od mírných infekcí kůže a měkkých tkání až po invazivní infekce, jako jsou sepse nebo pneumonie (Tam, Torres, 2019). K izolaci poprvé došlo v roce 1880 z hnisu chirurgické rány skotským chirurgem Alexandrem Ogstonem (Thomer *et al.*, 2016) a posléze v roce 1884 došlo k odlišení dvou rodů na základě pigmentace jejich kolonií, a to německým chirurgem Antonem Rosenbachem. Jednalo se o žluté kolonie *S. aureus* a bílé kolonie *S. albus*, který je v současnosti znám pod jménem *S. epidermidis* (Oliveira *et al.*, 2018).

Všestrannost *S. aureus* přežít imunitní hostitelskou odpověď a vyvolat u něho onemocnění záleží především na jeho faktorech virulence. Patogeneze *S. aureus* spočívá na produkci povrchových proteinů, které umožňují adhezi bakterií v hostitelských tkáních, sekreci celé řady extracelulárních toxinů či enzymů, jenž ničí hostitelské tkáně a buňky. Dále závisí na vyhybání se či znemožnění imunitní obrany hostitele a na růstu s následným šířením bakterií v hostitelských buňkách (Kong *et al.*, 2016). Nejdůležitější roli hrají tedy toxiny, ty můžeme rozdělit do tří hlavních skupin, a to na exofoliativní toxiny, superantigeny a na toxiny vytvářející póry. Poslední skupinu můžeme ještě dále dělit na 4 typy, hemolysin- α , hemolysin- β , leukotoxiny a moduliny rozpustné ve fenolu (PSMs). Díky své virulenci se toxiny podílejí na řadě onemocnění jako je syndrom toxického šoku, stafylokokový syndrom opařené kůže, nekrotizující pneumonie nebo na kožních infekcích (Oliveira *et al.*, 2018).

S. aureus je druhem, který je přirozeně náchylný k antibiotikům, nicméně v průběhu let se stal rezistentní prakticky vůči každému antibiotiku (Monaco *et al.*, 2016). Vznik antibiotické rezistence lze znázornit prostřednictvím vln. K první vlně došlo v polovině 40. let minulého století, kde vzrostly nozokomiální infekce, které byly rezistentní na penicilin a na počátku 50. a 60. let se staly pandemií (Chambers, DeLeo, 2009). Druhá vlna začala na počátku 60. let, kdy krátce po zavedení methicillinu byl identifikován první MRSA (methicillin-rezistentní *S. aureus*) v Londýnské nemocnici. Rezistence byla způsobena získáním nového gen *mecA*, který klonuje protein vázající penicilin a činí kmen rezistentní vůči všem β -laktamovým antibiotikům, včetně antistafylokokovým penicilinům, cefalosporinům a karbapenemům (Monaco

et al., 2016). K dalším vlnám docházelo v polovině 70. let a 90. let, kde docházelo k výskytům nových kmenů MRSA a v roce 2002 byl poprvé identifikován kmen vankomycin-rezistentní *S. aureus* (VRSA) (Chambers, DeLeo, 2009).

1.2.1.7.1 Infekce krevního řečiště

Bakteriémie je pravděpodobně jedna z nejvíce popisovaných projevů infekce *S. aureus*. Incidence ve vyspělých zemích se odhaduje na 10 až 30 případů ze 100 000 ročně. Výskyt bakteriémie je vysoce spjatý s věkem. Podle dosavadních studií bylo odhaleno, že bakteriémie se nejvíce objevuje v prvním roce života a dále dochází k nárůstu s postupujícím věkem. Další rizikovou skupinou jsou lidé infikovaní HIV nebo drogově závislí. Běžnými primárními zdroji infekce jsou vaskulární katétry a s nimi související infekce kůže a měkkých tkání, pleuropulmonální a osteoartikulární infekce či infekční endokarditida (Tong *et al.*, 2015).

1.2.1.7.2 Infekce kůže a měkkých tkání

Při poruše kožní bariéry následkem traumatu nebo po chirurgickém zákroku umožňuje vstup *S. aureus* do podkožních tkání. Mimo jiné k infekci může dojít i na místech bez zjevného porušení, například u vlasových folikulů (folikulitida), bulózní nebo povrchní léze (impetigo) nebo jako hluboké a splynulé abscesy (furunkl a karbunkl). Souhrnně tyto infekce nazýváme jako infekce kůže a měkkých tkání, které se projevují hnisavými exsudáty vypuštěné z hnisavých míst (Thomer *et al.*, 2016). Vyskytující se infekce mohou být benigního charakteru, ale mohou být i život ohrožující (Tong *et al.*, 2015).

1.2.1.7.3 Osteoartikulární infekce

S. aureus je běžným patogenem u osteoartikulárních infekcí. Ty můžeme rozdělit na 3 hlavní skupiny, a to na osteomyelitidy, protetické kloubní infekce a kloubní septickou artritidu (Tong *et al.*, 2015). Osteomyelitida je popisována jako infekce kostí a důsledkem je hluboká kostní destrukce, kterou doprovází ztráta vaskulární architektury kosti, což má za následek snížení dodávek antimikrobiálních látek do místa infekce. Léčba těchto infekcí spočívá v podávání antibiotik ve spojení s chirurgickým zákrokem, který se snaží o odstranění infikované nebo devitalizované kosti (Brandt *et al.*, 2019).

1.2.2 Kvasinky a plísně

1.2.2.1 *Candida albicans* (*C. albicans*)

C. albicans je nejčastějším lidským fungálním patogenem způsobující onemocnění od slizničních až po život ohrožující systémové infekce. Jedná se o oportunistický patogen (Tsui *et al.*, 2016), také se přirozeně vyskytuje v lidském mikrobiomu, kde asymptomaticky kolonizuje GI trakt, reprodukční trakt, ústní dutinu a kůži většiny lidí. U populace se zdravým imunitním systémem je často neškodný a udržovaný v rovnováze s ostatní mikrobiotou. Nicméně pokud nastanou změny v hostitelské mikrobiotě, například po požití antibiotik, nebo v imunitě hostitele, týká se především imunosupresivních pacientů nebo jedinců, kteří prodělali infekci způsobenou jiným mikroorganismem, může dojít k přemnožení *C. albicans*, což vyústí v infekci (Nobile, Johnson, 2015).

C. albicans je schopna infikovat různé niche hostitele prostřednictvím jeho širokou škálou faktorů virulence. Jedním z faktorů virulence je její pozoruhodná morfologická přeměna z kvasinkové formy do formy hyf, tento přechod se nazývá dimorfismus. Mezi další důležité faktory patří exprese adhezinů a invazinů na buněčném povrchu, tvorba biofilmů či sekrece hydrolytických enzymů (Mayer *et al.*, 2013).

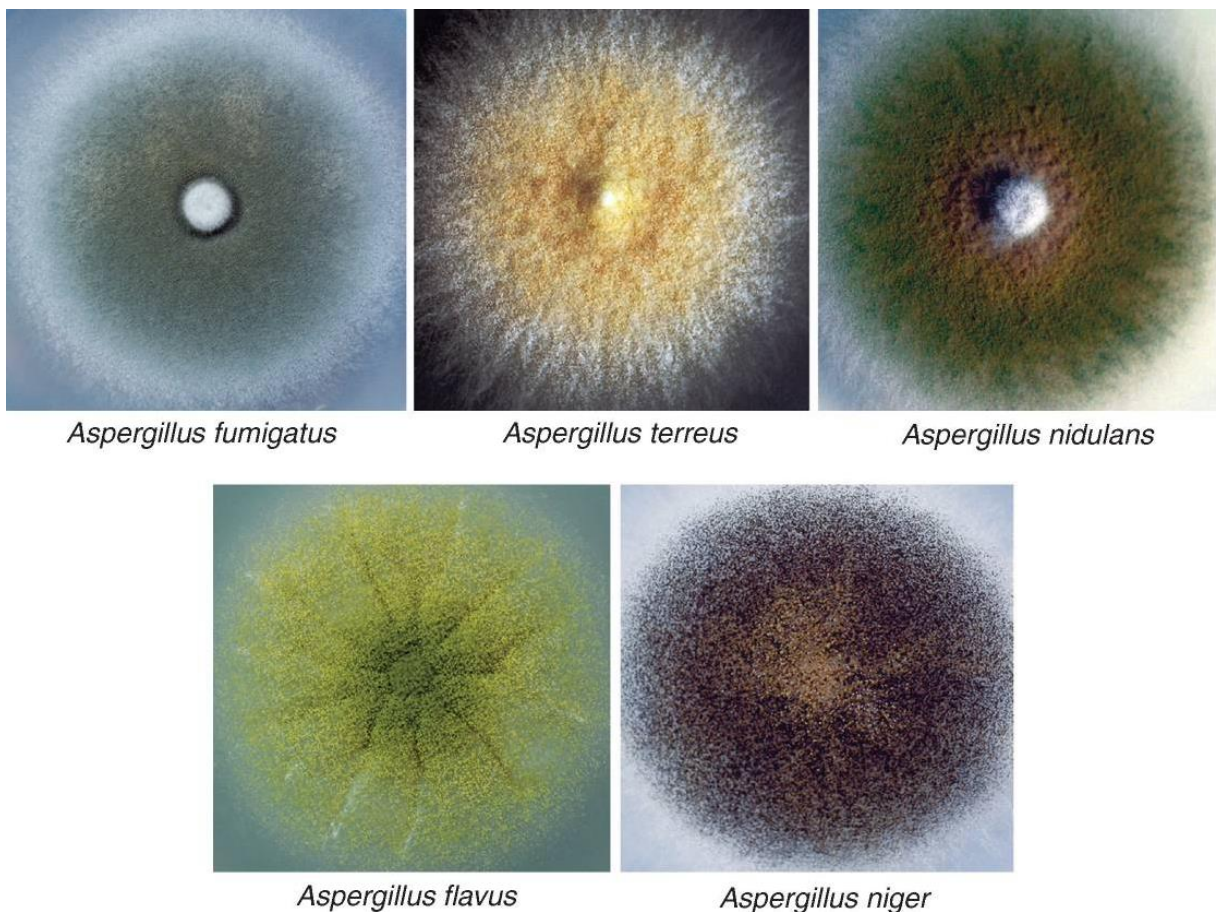
Tato kvasinka je jedna z nejvíce identifikovaných mikroorganismů způsobující nozokomiální infekce, je schopná napadnout jakoukoliv část těla hostitele od hlubokých ran a orgánů až po povrchová místa. Dále dokáže přilnout na různé katétry či různé zavedené lékařské implantáty, což z ní činí, že je třetím nejvíce izolovaným mikroorganismem z krevního řečiště u hospitalizovaných pacientů, u kterých dochází k úmrtnosti až z 50 % (Tsui *et al.*, 2016).

1.2.2.2 *Aspergillus brasiliensis* (*A. brasiliensis*)

A. Brasiliensis spadá do *Aspergillus* sekce *Nigri*, což je skupina příbuzných druhů, které jsou morfologicky velmi podobné *A. niger*, nicméně k jejich odlišení dochází na základě citlivosti na různá antimykotika (Frías-De-León *et al.*, 2018). Dle provedené studie, která zkoumala faktory virulence *A. brasiliensis* (mimo jiné i na *A. niger* a *A. oryzae*), bylo zjištěno, že *A. brasiliensis* je schopen jejich produkce. Jedná se tedy o tvorbu biofilmu, produkci α -amylázy, proteinázy, pektinázy, fosfolipázy a hemolysinů (Raksha *et al.*, 2017).

Rod *Aspergillus* způsobuje u lidí onemocnění aspergilóza. Toto onemocnění se může projevovat od alergické reakce až po invazivní aspergilózy (IA) (Sugui *et al.*, 2014). Nejčastějším místem vstupu infekce do těla je prostřednictvím plic, a to až z 90 %. Rozlišujeme 3 typy plicní aspergilózy – bronchoinvazivní, angioinvazivní a nekrotizující aspergilózu. Dále další dvě častá lokace vzniku aspergilózy mimo plíce jsou paranazální dutiny (sinoorbitální IA) či CNS (nitrolební aspergilóza). Méně často se může projevovat i kožní forma IA. Nicméně může být postižen jakýkoliv orgán (Bartáková *et al.*, 2007).

Patogenní druhy, které mohou způsobovat toto onemocnění u lidí řadíme do 5 sekcí *Aspergillus* – *Fumigati*, *Flavi*, *Nigri*, *Terrei* a *Nidulante*. Jejich odlišení můžeme vidět na následujícím obrázku č. 7 (Sugui *et al.*, 2014).



Obrázek 7: Patogenní druhy *Aspergillus* na Czapek-Dox agaru (Sugui *et al.*, 2014)

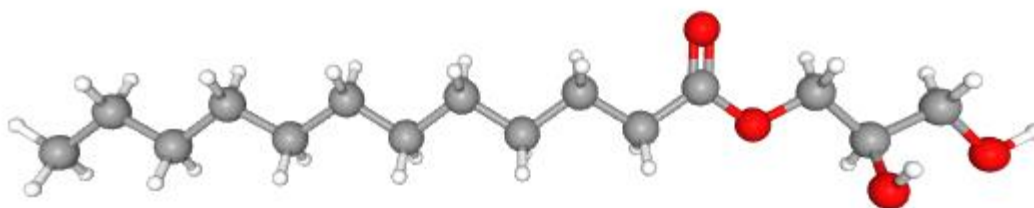
1.3 Monolaurin

Monolaurin, též známý pod názvem glycerol monolaurát, se řadí mezi monoglyceridy. Jedná se o přírodní sloučeninu, která se nalézá v kokosovém oleji či mateřském mléce (Seleem *et al.*, 2016). Jeho antimikrobiální schopnosti tkví v potlačení růstu a virulenci četných grampozitivních a gramnegativních bakterií, hub a obalených virů (Zhang *et al.*, 2016). Dále bylo zjištěno, že tato sloučenina je schopná zabít kultury *Bacillus* a *Clostridium* včetně jejich spor (Schlievert *et al.*, 2018). Z několika studií také vyplynulo, že monolaurin potlačuje zánětlivé procesy, což naznačuje, že by tato látka mohla mít i imunomodulační účinky. Zejména byly testované T buňky, které byly ošetřeny právě monolaurinem, u nich byla zjištěna snížená buněčná proliferace, když byly stimulovány PMA, konkanavalinem A nebo toxickým šokovým toxinem-1 (TSST-1) (Zhang *et al.*, 2016).

Monolaurin je zařazen úřadem Pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) do skupiny Všeobecně považovaný za bezpečný (GRAS) a je začleněn do různých produktů, jedná se například o deodoranty, pleťové vody a jinou kosmetiku. Dále je široce dostupný jako homeopatický doplněk a v potravinářství se používá jako konzervant či emulgátor potravin (Zhang *et al.*, 2016). Nicméně nesmí být překročena denní dávka, která je maximálně 100 mg/ml na den (Seleem *et al.*, 2016). Jedinou nevýhodou monolaurinu je jeho špatná rozpustnost ve vodě, což dále může způsobovat problémy s jeho podáváním skrze různé cesty (Umerska *et al.*, 2017)

1.3.1 Struktura monolaurinu

Chemické složení tohoto monoesteru zahrnuje dvě významné složky, a to glycerol (alkohol, -OH) a kyselinu laurovou (mastná kyselina, -C(=O)-OH). Mezi nimi dochází k tvorbě tzv. esterové vazby (R-CO-O-R'). Jeho sumární vzorec zní $C_{15}H_{30}O_4$.

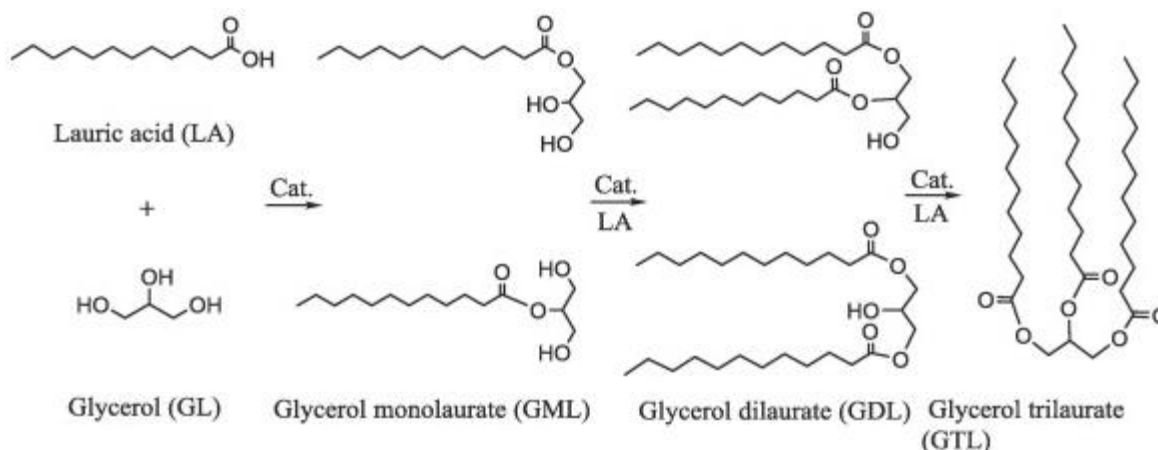


Obrázek 8: 3D konformace monolaurinu, Dostupné z:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/glycerol%20monolaurate#section=3D-Conformer>

1.3.2 Syntéza monolaurinu

Syntéza monolaurinu může být provedena více způsoby. Prvním způsobem je esterifikace, která je nejvíce používaná, dochází k vytvoření esterové vazby mezi kyselinou laurovou a glycerolem za pomoci kyselého katalyzátoru. Druhý způsob přípravy se provádí transesterifikací oleje z palmových jader nebo z kokosového oleje. Poslední způsob je pomocí glycerolýzy methyllaurátu za pomoci použití základního katalyzátoru (Setianto *et al.*, 2017)



Obrázek 9: Syntéza monolaurinu (Han *et al.*, 2019)

1.3.3 Antibakteriální účinky

Antibakteriální vlastnosti mastných kyselin a jejich esterů jsou už v posledních několika desetiletích velmi studovány, a právě monolaurin byl již z několika provedených studií shledán nejvíce nejúčinnější látkou z těchto sloučenin (Gil *et al.*, 2017). Antibakteriální účinky monolaurinu spočívají hlavně v narušení bakteriálních buněčných membrán s jejich následnou dezorganizací, nicméně se toto narušení u jednotlivých bakteriálních kmenů liší (Kovanda *et al.*, 2019). Také je vysoce účinný v inhibici produkce TSST-1 či exprese virulenčních faktorů včetně proteinu A, α -hemolysinu, β -laktamázy a indukce rezistence vankomycinu u *E. faecalis*. Mimo jiné nemá monolaurin nepříznivé účinky na střevní probiotické bakterie jako jiná konvenční antibiotika (Lieberman *et al.*, 2006).

Byla u něj zjištěna širokospektrální baktericidní aktivita zejména proti grampozitivním bakteriím odebrané například z kožních povrchových infekcí (Chinatankul *et al.*, 2018), dále má monolaurin antimikrobiální účinky i proti gramnegativním bakteriím. Nicméně rozdíl mezi těmito dvěma skupinami bakterií tkví v minimální inhibiční koncentraci (MIC), kde MIC pro grampozitivní bakterie je v rozmezí od 10 do 500 mg/L oproti 600 až 10 000 mg/L

pro gramnegativní bakterie (Kovanda *et al.*, 2019). Pro zvýšení účinků monolaurinu na gramnegativní bakterie je zapotřebí ho kombinovat například s vysokými teplotami, mrazem, okyselujícími látkami a chelatačními činidly (EDTA) (Dufour *et al.*, 2007).

1.3.4 Antivirulentní účinky

Bylo zjištěno, že monolaurin má též antivirulentní účinky. Je hlavně virucidní pro obalené viry, pravděpodobně díky tomu, že je schopný interferovat, a to do fúze virů se savčími buňkami (Schlievert, Peterson, 2012). Dále je schopný do určité míry inaktivovat některé viry jako jsou HIV, spalničky, Herpes simplex-1 či cytomegalovirus (Lieberman *et al.*, 2006).

1.3.5 Antimykotické účinky

Mezi další prospěšné efekty monolaurinů řadíme účinky antimykotické. Z několika studií bylo hlášeno, že některé plísně či kvasinky byly inaktivovány či dokonce zabity monolauriny, jednalo se především o kmen *C. albicans* (Lieberman *et al.*, 2006). Tyto účinky spočívají především v inhibici klíčení spor a brání též radiálnímu růstu (Chinatangkul *et al.*, 2018).

1.3.6 Další účinky

Bylo také zjištěno, že monolaurin má i kromě mikrobicidních účinků jiné prospěšné účinky. Ty například souvisejí se stabilizací sliznice a kožních povrchů, a tím dokáže zabránit vzniku zánětu či jiné infekce (Chinatangkul *et al.*, 2018). Z další klinické studie vyplývá, že monolaurin, který byl aplikovaný na tampony (přibližně se jednalo o 8 mg) měl pozitivní účinky na vaginální zdraví, tím že dokázal redukovat exotoxiny produkované *S. aureus*. Z dalšího výzkumu vyplynulo, že monolaurin je též potencionální imunopresivum, které by se dalo aplikovat na autoimunitní, psoriázové a střevní zánětlivé onemocnění, které je založené na účinné protizánětlivé aktivitě (Mo *et al.*, 2019).

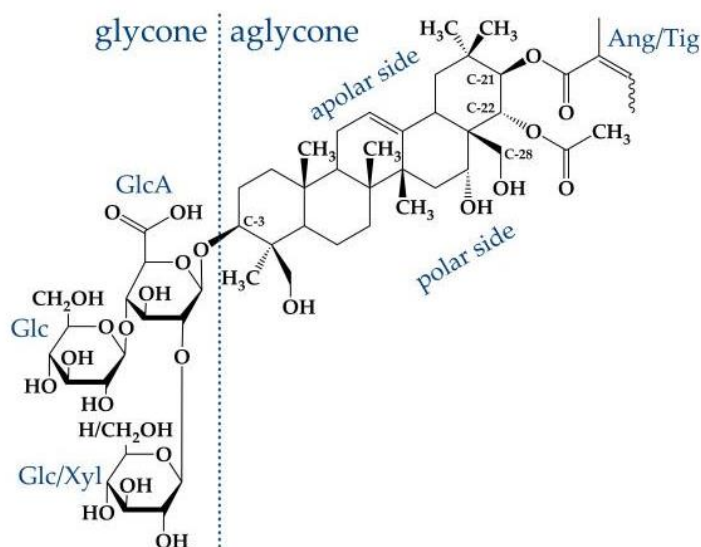
1.4 β -Aescin

β -Aescin byl poprvé objeven v 60. letech 20. století Lorenzem a jeho kolektivem. Tito vědci zjistili, že v semenech *Aesculus hippocastanum* neboli v koňském kaštanu se nalézá frakce ze směsi pentacyklických triterpenických saponinů, které později identifikovali jako protoescigenin a barringtogenol, následně byla tato frakce pojmenována jako β -Aescin (Gallelli, 2019).

β -Aescin se hojně používá v kosmetickém a farmakologickém průmyslu. Jedná se o velmi bezpečnou a velmi tolerovanou látku. Její využití je například při léčbě posttrombotického syndromu, chronické žilní nedostatečnosti, dále vykazuje velmi dobré účinky při léčbě artritidy a pravděpodobně má i potenciál jako protirakovinný lék v případě glioblastoma multiforme, což je nejčastější a nej malignější gliom mozku (Geisler *et al.*, 2020) nebo kolorektálního karcinomu. β -Aescin je schopný vyvolat zastavení rakovinového bujení v G1-S fázi a zcela potlačuje buněčnou proliferaci (Li *et al.*, 2019)

1.4.1 Struktura β -Aescinu

Chemicky se tato sloučenina skládá z hydrofobní (aglykonické) části a z hydrofilní (glykonické) části. Glykonická část obsahuje kyselinu glukuronovou, dále glukózu či xylózu. V aglykonické části se nachází triterpenová páteř, která je z jedné strany mírně polární a z druhé mírně nepolární, dále jsou zde napojené organické kyseliny – angeliková nebo tiglová a octová. Molekulový vzorec β -Aescin je $C_{55}H_{86}O_{24}$ (Geisler *et al.*, 2020).



Obrázek 10: Molekulová struktura β -Aescinu (Geisler *et al.*, 2020)

1.5 Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku podle normy ČSN EN ISO 11930

Mezinárodní norma ČSN EN ISO 11930, která byla vydaná v červenci v roce 2019, je určena k použití při celkovém hodnocení antimikrobiální ochrany daného kosmetického přípravku. Tato norma ČSN EN ISO 11930 nám poskytuje řadu kroků, které jsou nezbytné k posouzení, zda testovaný kosmetický výrobek splňuje či nesplňuje daná kritéria. K testování se využívá referenční metoda, a to zkouška účinnosti konzervace neboli provokační test, a dále je zde zahrnut postup hodnocení celkové antimikrobiální ochrany kosmetického přípravku, jenž není považován za málo rizikový na základě posouzení rizik popsané v normě ČSN EN ISO 29621 (ČSN EN ISO 11930, 2019).

Pro zkoušku účinnosti konzervace se používají normou stanovené mikroorganismy. Jedná se konkrétně o 3 bakteriální kmeny – *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, dalším testovaným mikroorganismem je kvasinka *Candida albicans* a v neposlední řadě se experimentuje na plísni *Aspergillus brasiliensis* (ČSN EN ISO 11930, 2019).

Nejdříve se výše zmíněné mikroorganismy vyočkují na živné média pro ně určená. Pro bakteriální kmeny se používá TSA agar a pro kvasinku SDA agar, oba tyto agary se nechávají inkubovat při teplotě $32,5 \pm 2,5$ °C po dobu 24 h pro bakterie a 48 h pro kvasinku. Pro zaočkování plísně se využívá PDA agar, na kterém je testovaná plíseň inkubována při teplotě $22,5 \pm 2,5$ °C po dobu 7 až 11 dní (ČSN EN ISO 11930, 2019).

Samotné testování účinnosti konzervace začíná přípravou jednotlivých mikrobiálních suspenzí, které se řídí McFarlandovou zákalovou stupnicí. Z takto zpracovaných suspenzí se část inokuluje do sterilních uzavíratelných nádob, ve kterých je již připravený naředěný vzorek. Tento zhotovený a zaočkovaný vzorek se uchovává ve tmě při laboratorní teplotě. Měření poklesu mikroorganismů ve vzorku se provádí po dobu 28 dní, a to v normou stanovených intervalech, konkrétně se jedná o 7., 14. a 28. den od prvotní inokulace vzorků (ČSN EN ISO 11930, 2019).

V normou stanovených dnech se odečty provádí odebráním 1 ml do připravených zkumavek s neutralizačním činidlem a nechají se po určitou dobu neutralizovat, následně

se z těchto zkumavek odebere opět 1 ml do zkumavek s fyziologickým roztokem, tyto kroky nám zajistí přípravu koncentrační řady od 10^1 po 10^5 . Poté se z každé zkumavky duplicitně vyočkuje určené množství na Petriho misky s odpovídající živnou půdou pro daný mikroorganismus a následně je roztok rozetřen sterilní L-hokejkou. Takto připravené Petriho misky se nechají inkubovat v termostatu po určitou dobu v závislosti na daném mikroorganismu (ČSN EN ISO 11930, 2019).

Po inkubaci dochází k vyhodnocení účinnosti konzervace pomocí metody počítání kolonií na počítadle. Vybírají se pouze misky, které splňují kritéria pro stanovení počtu mikroorganismů. Kritérium pro bakterie a kvasinky je rozmezí od 30 do 300 kolonií a pro plísně je toto rozmezí od 15 do 150. Dále u těchto misek, které tato kritéria splňují se vypočítá logaritmická snížení, která se porovnávají s hodnotami stanovými normou. Konkrétně se jedná o snížení tří a více logaritmických řádů pro bakterie nebo o snížení o 1 a více řádů v případě kvasinky, přičemž nedochází k dalšímu zvyšování počtu testovaných mikroorganismů po celkovou dobu zkoušení, tedy 28 dní (ČSN EN ISO 11930, 2019).

1.6 Stanovení baktericidní, levurocidní a fungicidní účinnosti antiseptických léčivých přípravků podle Českého lékopisu

Český lékopis z roku 2017 – Doplněk 2018 je právní norma vydaná Ministerstvem zdravotnictví ČR. Je určena k posouzení normou stanovených požadavků na jakost, dále na postup při přípravě, zkoušení, skladování a v neposlední řadě na dávkování léčiv. Platnost této normy je od 1. 12. 2018 a je určena především farmaceutům, lékařům, biochemikům a dalším osobám v tomto odvětví (ČL 2017 - Dopl. 2018, 2018).

Stanovení baktericidní, fungicidní a levurocidní účinnosti antiseptických léčivých přípravků je popsáno v kapitole 5.1.11. Tato kapitola nám charakterizuje postupy zkušebních testů, které se právě používají ke stanovení proti potencionálním patogenním mikroorganismům vůči antiseptickým léčivým přípravkům. Podmínkou pro tyto přípravky je, že jsou mísitelné s vodou a dále jsou určené pro přímé podání na povrch kůže, případně na sliznici (ČL 2017 - Dopl. 2018, 2018).

V rámci tohoto testování se používají normou stanovené mikroorganismy. Přesněji se jedná o 4 bakteriální kmeny – *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*. Dalšími testovanými mikroorganismy jsou z řad kvasinek a plísně *Candida albicans* a *Aspergillus brasiliensis* (ČL 2017 - Dopl. 2018, 2018).

V první řadě se výše zmíněné mikroorganismy zaočkují na příslušné živné půdy. Pro bakteriální kmeny se zde používá agarová půda s hydrolyzáty sóji a kaseinu (nebo tekutá půda), a pro kvasinku a plíseň se používá Sabouraudův glukózový agar (nebo tekutá půda). Agar s bakteriemi se nechá inkubovat při teplotě 30-35 °C po dobu 18 až 24 hodin. Pro Sabouraudův glukózový agar je inkubační doba po dobu 2 až 3 dnů při pokojové teplotě 20-25 °C (ČL 2017 - Dopl. 2018, 2018).

Začátek testování proti mikrobiální účinnosti spočívá přípravou jednotlivých mikrobiálních suspenzí podle McFarlandovy zákalové stupnice. Druhým krokem je příprava zkoušeného roztoku antiseptického přípravku a následuje výběr vhodné metody testování vzorků. V rámci testování se používají dvě metody, a ty jsou neutralizační ředění a membránová filtrace (ČL 2017 - Dopl. 2018, 2018).

Dále se připraví validační suspenze, která bude obsahovat 100 až 1000 CFU zkoušených mikroorganismů. Tato validační suspenze se posléze využívá v kontrole experimentálních podmínek, kontrole neutralizačního činidla a v kontrole metody neutralizačního ředění pro první metodu a pro druhou metodu také v kontrole experimentálních podmínek a v kontrole membránové filtrace. Tyto kontroly nám potvrzují správnost postupu a také, zda použitá činidla jsou plně funkční (ČL 2017 - Doplnění 2018, 2018).

Vyhodnocení spočívá v metodě počítání kolonií na mikrobiologickém počítadle. Vybírají se pouze misky, které splňují kritéria pro stanovení počtu mikroorganismů. Kritérium pro bakterie a kvasinky je v rozmezí od 30 do 300 kolonií a pro plísňe je toto rozmezí od 15 do 150. Misky se zaočkovanou validační suspenzí jsou zprůměrovány a je pro ně vypočten 0,05násobek CFU. Kritérium pro splnění podmínek pro veškeré zmíněné kontroly je, že množství CFU v miskách s kontrolami nesmí být nižší, než je 0,05násobek počtu CFU ve validační suspenzi. Dalším krokem je vyhodnocení účinku antiseptického přípravku podle kritérií přijatelnosti. Aby měl přípravek baktericidní účinek musí dojít k poklesu nejméně o 5 log, pro levurocidní a fungicidní účinek je tato podmínka snížení nejméně od 4 log (ČL 2017 - Doplnění 2018, 2018).

2 Experimentální část

2.1 Vzorky

Veškeré testované vzorky byly poskytnuty firmou K2 Pharm s.r.o. se sídlem v Opavě v rámci řešení projektu TAČR: Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu – číslo projektu: TH02010762

Dodané vzorky:

Testování dle normy ČSN EN ISO 11930

a₁) Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku

- SE MONOLaurin OA88729, šarže 281218-MS
- SE MONOLaurin OA88730, šarže 271218-MS
- MONOLaurin SE OA92502, šarže 100419-MS

a₂) Vzorek na potvrzení mikrobicidní čistoty

- BETA-AESCIN OA92503, šarže 021017, 15 g

Testování dle Českého lékopisu

b₁) Náplně enterosolventních tobolek

- MONOLaurin SE, šarže 170719-MS, 250 g
- MONOLaurin SE tobolky v HPMC cps „0“ náplň 430 mg, šarže 170519-MS, 60 ks
- MONOLaurin SE Enterosolventní tobolky, náplň 645 mg, šarže 110519-MS, 60 ks

b₂) Vzorky desinfekcí na povrchy a lidskou kůži

- Dezinfekční antimykotický sprej, šarže 150819-MS
- Antimikrobiální sprej, šarže 031219-MS, 250 ml

Vzorky byly testovány až ve třech koncentracích a to v 0,01 %; 0,1 % a 1 %. Vzorky monolaurinů a beta-aescinu byly dodány ve formě prášku. Tento prášek byl ředěn na vyžadované koncentrace pomocí sterilní destilované vody, stejně byl naředěn i sprej.

2.2 Použité mikroorganismy

Veškeré použité mikroorganismy byly poskytnuty z České sbírky mikroorganismů z Masarykovy Univerzity v Brně.

<i>Escherichia coli</i>	CCM 4225
<i>Escherichia coli</i>	CCM 4517
<i>Escherichia coli</i>	CCM 2024
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954
<i>Escherichia coli</i>	CCM 5172
<i>Escherichia coli</i>	CCM 8874
<i>Enterococcus hirae</i>	CCM 2423
<i>Listeria monocytogenes</i>	CCM 5576
<i>Proteus vulgaris</i>	CCM 1799
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 1961
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 3955
<i>Salmonella enterica</i>	CCM 4420
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 2022
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4227
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4516
<i>Candida albicans</i>	CCM 8215
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	CCM 8222

2.3 Kultivační média a pracovní roztoky

Brain Heart Infusion Broth, HiMedia Laboratories (Indie)

Složení: Telecí mozková infúze-sušina (12,5 g/l), infúze z hovězího srdce-sušina (5 g/l), masový pepton (10 g/l), glukóza (2 g/l), chlorid sodný (5 g/l), hydrogenfosforečnan disodný (2,5 g/l)

Příprava: 18,5 g prášku bylo naváženo a rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Roztok byl po dobu 15 minut sterilizován při 121 °C v autoklávu. Následně byl tento roztok uchován při chladničkové teplotě. Finální pH připraveného roztoku bylo při 25 °C $7,4 \pm 0,2$.

Fyziologický roztok

Složení: Chlorid sodný (8,5 g/l), destilovaná voda

Příprava: 4,25 g chloridu sodného bylo naváženo a rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Roztok byl po dobu 15 minut sterilizován při 121 °C v autoklávu. Následně byl tento roztok uchován při chladničkové teplotě.

Mueller Hinton agar, HiMedia Laboratories (Indie)

Složení: Hovězí masová infúze (300 g/l), kaseinový hydrolyzát (17,5 g/l), škrob (1,5 g/l), agar (17 g/l)

Příprava: 19 g prášku bylo naváženo a rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Roztok byl po dobu 15 minut sterilizován při 121 °C v autoklávu. Po sterilizaci byla tato směs ochlazená na 45-50 °C, dále promíchána a rozlita do sterilních Petriho misek. Následně byly Petriho misky uchovány při chladničkové teplotě. Finální pH připraveného média bylo při 25 °C $7,3 \pm 0,1$.

Neutralizátor Eugon LT 100 Broth Base w/o Tween 80, HiMedia Laboratories (Indie)

Složení: Trypton (15 g/l), sójový pepton (5 g/l), chlorid sodný (4 g/l), L-cystin (0,7 g/l), siřičitan sodný (0,2 g/l), glukóza (5,5 g/l), vaječný lecitin (1 g/l), tritox x-100 (1 g/l)

Příprava: 16,2 g prášku bylo naváženo a rozpuštěno v 500 ml destilované vody obohacené 2,5g polysorbátu 80 (tween 80). Roztok byl po dobu 15 minut sterilizován při 121 °C v autoklávu. Po sterilizaci byla tato směs ochlazená na 45-50 °C, dále promíchána a rozlita do sterilních Petriho misek. Následně byly Petriho misky uchovány při chladničkové teplotě. Finální pH připraveného média bylo při 25 °C $7,0 \pm 0,2$.

Sabouraud Dextrose agar, HiMedia Laboratories (Indie)

Složení: Glukóza (40 g/l), mykologický pepton (10 g/l), agar (15 g/l)

Příprava: 32,5 g prášku bylo naváženo a rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Roztok byl po dobu 15 minut sterilizován při 121 °C v autoklávu. Po sterilizaci byla tato směs ochlazená na 45-50 °C, dále promíchána a rozlita do sterilních Petriho misek. Následně byly Petriho misky uchovány při chladničkové teplotě. Finální pH připraveného média bylo při 25 °C $5,6 \pm 0,2$.

Soyabean Casein Digest agar (Tryptone Soya Agar), HiMedia Laboratories (Indie)

Složení: Trypton* (15 g/l), sójový pepton (5 g/l), chlorid sodný (5 g/l), agar (15 g/l)

*pankreatický natrávený kasein

Příprava: 20 g prášku bylo naváženo a rozpuštěno v 500 ml destilované vody. Roztok byl po dobu 15 minut sterilizován při 121 °C v autoklávu. Po sterilizaci byla tato směs ochlazená na 45-50 °C, dále promíchána a rozlita do sterilních Petriho misek. Následně byly Petriho misky uchovány při chladničkové teplotě. Finální pH připraveného média bylo při 25 °C $7,3 \pm 0,2$.

2.4 Chemikálie

Destilovaná voda

Ethanol 96%

Chlorid sodný

Polysorbát 80

Hovězí sérový albumin BSA

2.5 Laboratorní přístroje

Analytické váhy KERN 444 a 445

Kern, Německo

Autokláv PS 20 A

BMT, ČR

Biologický termostat

POL EKO, Polsko

Denzitometr DEM-1

BIOSAN, Litva

Chladnička HS 3966

Gorenje, Slovinsko

Chladnička ZRB 36 ND

Zanussi, ČR

Mikroskop Nikon ECLIPSE E200

Nikon, Japonsko

Počítadlo kolonií LKB 2002

POL-EKO, Polsko

Sterilizátor STERILAB

BMT, ČR

UV lampa MD 118

Biosan, Polsko

Vodní lázeň s termostatem Julabo ED-5M/B

Julabo, Německo

Vortex V-1 plus

Biosan, Polsko

2.6 Laboratorní pomůcky

Automatické pipety Eppendorf

Automatické pipety WITOPET

Erlenmayerovy baňky

Mikroskopická krycí a podložní sklíčka

Odměrný válec

Plastové a kovové stojany na zkumavky

Plastové špičky

Skleněné zkumavky 15 ml

Sterilní jednorázové plastové L-hokejky

Sterilní jednorázové plastové mikrotitrační destičky s víčky

Sterilní jednorázové plastové očkovací kličky

Sterilní plastové Petriho misky

Sterilní plastové zkumavky 15 a 50 ml

2.7 Metodika

2.7.1 Postup č. 1 – Neutralizační ředění

Den před testováním účinných látek byly jednotlivé bakteriální kmeny (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* a *Staphylococcus aureus*) přeočkovány sterilní plastovou kličkou na Mueller Hinton agar, případně na Trypton Soya agar a ponechány po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C na inkubaci. Druhý den byly testované látky, které byly dodány v podobě prášku a v neředěné formě odváženy na analytických vahách. Vážil se 1 g vzorku, který byl asepticky přenesen do 15 ml sterilních plastových zkumavek. Do těchto zkumavek bylo odpipetováno 9 ml sterilní destilované vody. Tento krok nám zajistil 10% roztok testované látky, a následně podle potřeby a podle zadání byly ředěním vytvářeny další potřebné koncentrace z tohoto původního roztoku, konkrétně se jednalo o koncentrace 1 %, 0,1 % a 0,01 %.

Po 24 h inkubaci byly z pracovních kultur zhotoveny mikrobiální suspenze podle McFarlandovy zákalové stupnice. Kolonie bakterií byly přeneseny z živných půd sterilními očkovacími kličkami do skleněných sterilních zkumavek, které obsahovaly 5 ml fyziologického roztoku. Tyto skleněné zkumavky obsahující fyziologický roztok s bakteriemi se pomocí vortexu homogenizovaly a posléze se vkládaly do denzitometru, který nám určoval zákal. Bakterie byly přenášeny a homogenizovány, dokud vytvořené inokulum nebylo rovno zákalu 1. stupně McFarlandovy zákalové stupnice, tj. $3 \cdot 10^8$ CFU/ml.

Poté bylo z každého inokula odpipetováno 0,1 ml roztoku do připravených 15 ml plastových zkumavek, které obsahovaly naředěný roztok vzorku o určité koncentraci s konečným objemem, který činil 10 ml. Každá sterilní plastová zkumavka obsahovala testovanou koncentraci vzorku a inokulum pouze jedné bakterie. Takto připravené a zaočkované zkumavky vzorků byly uchovávány v temném místě při laboratorní teplotě 25 °C následující dny.

Podle mezinárodní normy ČSN EN ISO 11930 byly odečty účinnosti konzervace a hodnocení antimikrobiální ochrany výrobku prováděny 7., 14. a 28. den po zahájení kultivace inokulovaného vzorku. Nicméně tyto odečty byly prováděny i 1. a 21. den, a to kvůli ověření, zda testované vzorky jsou zcela čisté a nenesou žádné známky nežádoucí kontaminace.

Ve stanovených dnech podle normy ČSN EN ISO 11930 bylo pro každou bakterii připraveno 5 sterilních plastových zkumavek, aby byla vytvořena desítková ředící řada. První zkumavka obsahovala 9 ml neutralizačního činidla a následující 4 zkumavky obsahovaly 9 ml fyziologického roztoku. Ze zkumavek obsahující vzorek s inokulem byl vždy odpipetován 1 ml plastovou sterilní špičkou do první zkumavky obsahující právě neutralizační činidlo a směs byla pečlivě promísená a nechána po vhodné dobu neutralizovat (1 minuta). V této první zkumavce bylo přítomno $3 \cdot 10^5$ CFU/ml bakterií. Ze zkumavky s neutralizačním činidlem byl opět odpipetován 1 ml do druhé zkumavky, která již obsahovala 9 ml fyziologického roztoku a počet bakterií byl roven $3 \cdot 10^4$ CFU/ml. Tento krok byl ještě 3x zopakován a byla vytvořena ředící řada o koncentracích 10^{-1} (1. zkumavka) až 10^{-5} (5. zkumavka), kde v poslední páté zkumavce byl počet bakterií roven $3 \cdot 10^1$ CFU/ml. Vždy byly všechny zkumavky pečlivě promísené. Poslední mililitr z páté zkumavky byl odpipetován do biologického odpadu.

Z této ředící řady bylo z každé zkumavky odpipetováno sterilní plastovou špičkou 0,1 ml roztoku na vhodné živné půdy pro bakterie, tj. Trypton Soya agar. Toto vyočkování bylo vždy prováděno v dubletech. Roztok byl na živné půdě rozetřen sterilními plastovými L-hokejkami. Poté byly tyto půdy obsahující bakterie inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Následující den byly misky vyhodnocovány metodou počítání kolonií na mikrobiologickém počítadle, které máme znázorněno na obrázku č. 11.



Obrázek 11: Počítadlo v laboratoři L1

Pro správné stanovení a vyhodnocování se vybíraly ty misky, které odpovídaly počtu bakterií v rozmezí 30-300 kolonií. Misky, které toto kritérium splňovaly, byly dosazeny do definované rovnice logaritmického snížení a výsledky byly porovnány s hodnotami určené normou (viz Tabulka 2)

- *Rovnice pro výpočet logaritmického snížení*

$$R_x = \log N_0 - \log N_x$$

N_0 počet mikroorganismů zaočkovaných v čase t_0

N_x počet mikroorganismů v časech odběru vzorku

Následně došlo k rozhodnutí, zda veškeré testované vzorky splňují definované podmínky antimikrobiální ochrany podle normy ČSN 11930 vůči jednotlivým mikroorganismům.

Tabulka 2: Kritéria hodnocení antimikrobiální ochrany pro bakterie a kvasinky podle ČSN EN ISO 11930

Požadované hodnoty snížení v log			
Mikroorganismy	Bakterie		
Interval	T7	T14	T28
Kritérium A	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
Mikroorganismy	Kvasinky		
Interval	T7	T14	T28
Kritérium A	≥1	≥1 a NI	≥1 a NI
*NI: žádné zvýšení počtu od předešlého intervalu			
T7, T14, T28 – časový interval zahájení kultivace inokulovaného vzorku po 7, 14 a 28 dnech			
Kritérium A – požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení podle přílohy B v ČSN EN ISO 11930			

2.7.2 Postup č. 2 – Baktericidní, levurocidní a fungicidní účinek

Nejdříve byly z požadovaných kmenů (*Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* a *Aspergillus brasiliensis*) připraveny pracovní kultury. Bakteriální kmeny byly přeneseny sterilní plastovou kličkou metodou izolace čárkováním na Petriho misku, která byla zalita Trypton Soya agarem a inkubovány 24 h při teplotě 37 °C. Kvasinka byla zaočkována stejným způsobem jako bakterie, změna byla pouze v živné půdě, tudíž byla nanášena na Sabouraud Dextrose agar a byla inkubována 48 h při teplotě 25 °C. Pro plíseň byla připravená zkumavka se šikmým agarem. Jako agar byl opět použit Sabouraud Dextrose agar. Plíseň byla nanášena sterilní plastovou kličkou odspoda zkumavky směrem nahoru, a to vlnitým pohybem, nakonec byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 5 dnů.

Po 24 h a 48 h inkubaci byly z pracovních kultur zhotoveny základní bakteriální a levurocidní suspenze podle McFarlandovy zákalové stupnice. Do skleněných sterilních zkumavek bylo napipetováno 5 ml fyziologického roztoku a přidány příslušné kolonie bakterií či kvasinky. Takto vytvořená inokula odpovídala 4. stupni McFarlandovy zákalové stupnice tj. 10^9 CFU/ml. Fungicidní suspenze byla připravena tak, že do zkumavky, ve které byla narostlá plíseň, se přidaly 3 ml fyziologického roztoku a 1-2 kapky polysorbátu 80 a řádně se promíchala, aby se uvolnily spory plísně. Posléze byl roztok se spory homogenizován ve sterilní skleněné baňce se skleněnými perlami a doplněn na 10 ml. Z takto zhotovené suspenze bylo odpipetováno sterilní špičkou 10 μ l do Bürkerovy komůrky, kde se počítalo 25 čtverců. Za ideální stav se považovalo, že na jeden čtverec, bude výskyt \pm 20 spor plísně, což odpovídá 10^6 spor v 1 ml.

Dalším krokem byla příprava zkoušeného antiseptického přípravku. Tento přípravek byl dodán v práškové formě v tabletách a v kapalně podobě. K testování byly určeny dvě koncentrace, a to 10 % a 1 %. Na analytických vahách bylo tedy odváženo 10 g a 1 g do 50 ml plastových zkumavek a doplněno sterilní destilovanou vodou.

Před zahájením zkoušení se teplota u všech používaných roztoků vyrovnala ve vodní lázni na teplotu 33 ± 1 °C. Příprava zkušební suspenze probíhala tak, že se smíchal do sterilní plastové zkumavky 1 ml hovězí sérový albumin s 1 ml základní suspenze (bakteriální, levurocidní nebo fungicidní) a ponechala se 2 minuty inkubovat. Dále se do této zkumavky přidalo 8 ml zkoušeného roztoku antiseptického přídatku. Tímto se dosáhlo přípravě zkušební suspenze,

kteřá odpovídala 10^8 CFU/ ml pro bakterie, nebo 10^7 CFU/ml pro kvasinky a plísň. Na dále v tomto postupu se připravilo pro kařký mikroorganismus 5 zkumavek pro desítkové ředění. První zkumavka obsahovala 8 ml neutralizačního činidla a 1 ml destilované vody, další čtyři zkumavky obsahovaly 9 ml fyziologického roztoku. Do první zkumavky s neutralizačním činidlem a vodou se přidal 1 ml zkušební suspenze a zkumavka se řádně promíchala a nechala se po vhodné dobu neutralizovat (10 s až 60 s). Po neutralizaci se opět odebral 1 ml a přenesl se do druhé zkumavky, tento proces probíhal až k páté zkumavce, kde poslední mililitr byl odpipetován do zkumavky s biologickým odpadem.

Z kařdé zkumavky bylo odpipetováno 0,1 ml sterilní plastovou špičkou na odpovídající živnou půdu. Pro bakterie byl použit Trypton Soya agar, pro kvasinku a plíseň Sabouraud Dextrose agar. Vyočkování probíhalo ve zdvojení pro kařdou koncentraci z ředící řady. Suspenze byla na agaru rozetřena sterilní plastovou L-hokejkou a naočkované agary byly inkubovány. Inkubace v termostatu byla pro bakterie 24 h ve $37\text{ }^\circ\text{C}$, pro kvasinku 48 h při $25\text{ }^\circ\text{C}$ a pro plíseň 5 dní při pokojové teplotě.

Dále následovaly přípravy kontrol. Nejdříve se vytvořila validační suspenze, kteřá obsahovala 100 CFU až 1000 CFU v jednom mililitru. Opět veškeré roztoky byly kalibrovány na teplotu $33\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$. Tato validační suspenze byla vytvořená ředěním základní suspenze. Pro kontrolu experimentálních podmínek se do sterilní plastové zkumavky převedl 1 ml hovězího sérového albuminu s 1 ml validační suspenze a zkumavka se nechala inkubovat po dobu 2 minut. Po inkubaci se do zkumavky přidalo 8 ml destilované vody a nechala se po vybranou dobu znovu inkubovat. Nakonec se 0,1 ml této suspenze přeneslo ve zdvojení metodou inokulace na odpovídající agar.

Další kontrolou byla kontrola neutralizačního činidla. Zde byl do sterilní plastové zkumavky odpipetován 1 ml hovězího sérového albuminu, 1 ml validační směsi a 8 ml neutralizačního činidla. Zkumavka se nechala po vhodné dobu opět neutralizovat a 0,1 ml roztoku bylo ve zdvojení inokulováno na odpovídající agar.

Poslední kontrolou byla kontrola neutralizačního ředění. V této kontrole se nejdříve převedl do sterilní plastové zkumavky 1 ml hovězího sérového albuminu, 1 ml fyziologického roztoku a 8 ml zkoušeného antiseptického přípravku a směs se nechala po kontaktní dobu inkubovat. Z této směsi byl odpipetován 1 ml do druhé zkumavky, kteřá obsahovala 8 ml

neutralizačního činidla a nechala se po vhodnou dobu neutralizovat. Následně se do této druhé zkumavky přidal 1 ml validační směsi a zkumavka se nechala inkubovat po dobu 30 minut. Po 30 minutách se odpipetovalo z tohoto roztoku 0,1 ml a ve zdvojení byl inokulován na odpovídající agar.

Vyhodnocování pro bakterie probíhalo následující den, tedy po inkubaci 24 h, u kvasinek po 48 h inkubaci a u plísní po pětidenní inkubaci. Na mikrobiologickém počítadle byly počítány misky s nárůstem kolonií. Misky s validační suspenzí byly zprůměrované a byl vypočten 0,05násobek CFU podle kritérií. Kritérium pro splnění podmínek pro výše zmíněné kontroly bylo to, že množství CFU v miskách s kontrolami nesmí být nižší, než je 0,05násobek počtu CFU ve validační suspenzi. Konečným hodnocením bylo hodnocení účinku antiseptického přípravku. Zde se porovnávalo, jestli dochází u jednotlivých mikroorganismů k jejich poklesu podle zadaných podmínek viz Kritéria přijatelnosti.

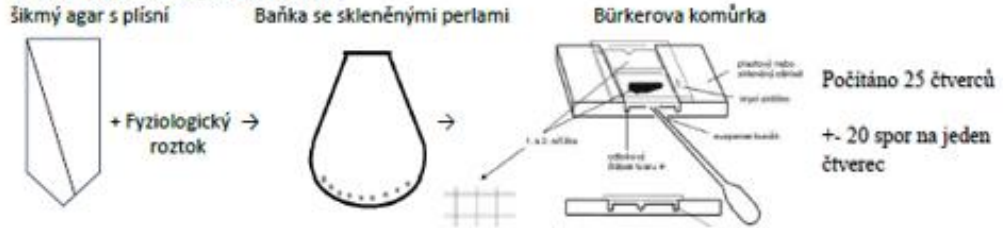
- *Kritéria přijatelnosti*

Přípravek má baktericidní účinek, jestliže definovaný počet CFU byl snížen nejméně o 5 log.

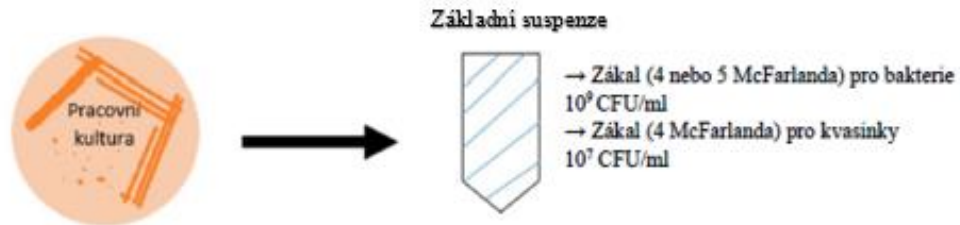
Přípravek má fungicidní účinek, jestliže definovaný počet CFU byl snížen nejméně o 4 log.

Přípravek má levurocidní účinek, jestliže definovaný počet CFU byl snížen nejméně o 4 log.

1. Krok - příprava fungicidní suspenze

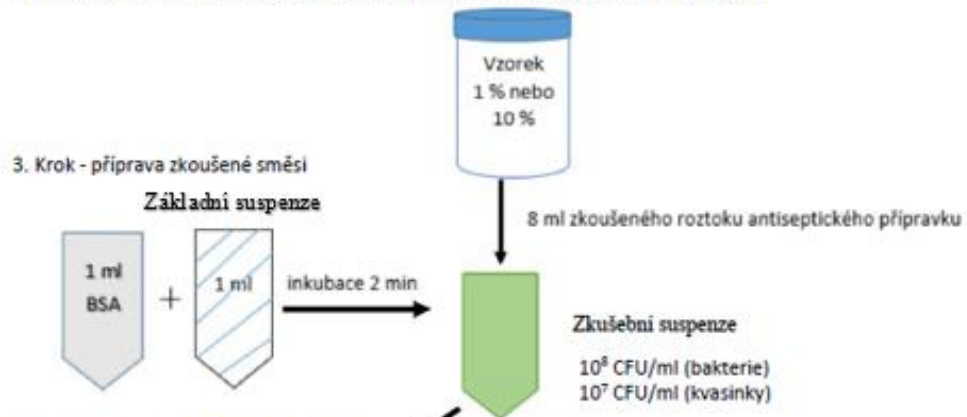


1 krok - příprava suspenze pro bakterie a kvasinky

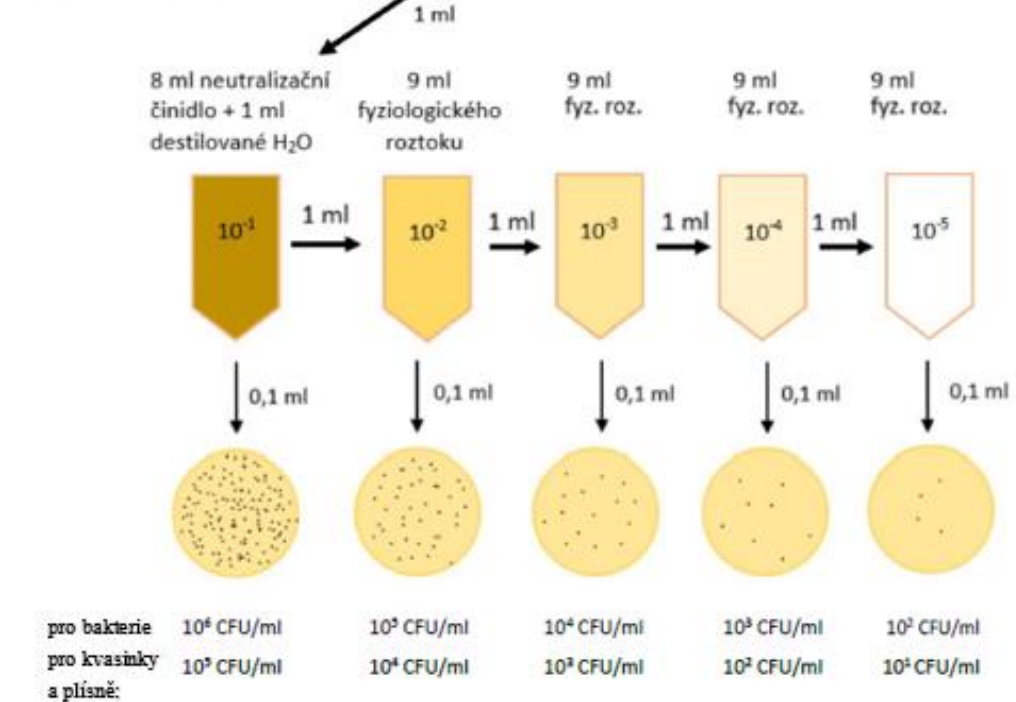


2. Krok - příprava zkoušeného roztoku antiseptického přípravku

Připraven smícháním sterilní destilované vody + zkoušeného antiseptického přípravku



4. Krok - metoda neutralizačního ředění



Obrázek 12: Schéma metody

3 Výsledky a diskuse

Tato diplomová práce je součástí projektu TH02010762 podporovaného TAČR, jehož název zní „Suplementy pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu“. Cílem tohoto projektu je vyvinout unikátní doplňky stravy ve formě tablet či kapslí obsahující monoglyceridy. Produkt bude unikátní v tom, že během řízeného rozpouštění (disoluce) během průchodu trávicím traktem, dopraví monoglyceridy až do tlustého střeva, kde budou mít pozitivní vliv právě na střevní mikrobiom.

Pro náplně enterosolventních vzorků byly použity vícevrstvé potažené tablety. Ty zaručují, že vzorek aktivní látky se uvolní v tenkém, nebo dokonce až v tlustém střevě. Tablety či kapsle jsou potažené několika vrstvami speciálních polymerů, které vzorek dokážou ochránit před nepříznivým kyselým prostředím žaludku a uvolní se, právě v té části našeho zažívacího traktu, kde je jejich biodostupnost pro lidské tělo nejvyšší. Těmto přípravkům se v praxi říká – Doplňky stravy s cíleným uvolňováním (targeted delivery supplements – TDS)

3.1 Testování 1 - norma ČSN EN ISO 11930

V rámci diplomové práce bylo nejdříve provedeno testování pomocí zátěžových testů podle normy ČSN EN ISO 11930. Zde byly testovány celkem 4 různé vzorky: SE MONOLAURIN OA88729; SE MONOLAURIN OA88730; MONOLAURIN SE OA92502 a BETA-AESCIN OA92503. Ty byly testované v koncentracích 0,01 %, 0,1 %, 1 % nebo 10 %.

Prvotní testování spočívalo v testování prvních dvou zmíněných vzorků. Jejich složení je zaznamenáno v následující tabulce č. 3.

Tabulka 3: Složení vzorků

Použité látky	MONOLAURIN SE OA88730 č.š. 27122018-MS	MONOLAURIN SE OA88729 č.š. 28122018-MS
Monomuls [®] 90 L12	297,00 g	247,50 g
POEM J -0021	1,50 g	1,25 g
Ryoto sugar ester L1695	1,50 g	1,25 g
L-HPC LH-11	x	10,00 g
Σ	300,00 g	260,00 g

Testování těchto dvou vzorků probíhalo od 25. 1. 2019 do 22. 2. 2019 a pouze pro koncentraci 10 %. Nicméně se testovalo i mimo normou stanovené dny, tím jsou myšlené konkrétní dny, a to hned první den po vyočkování a poté jednadvacátý den. Důvodem přidáním těchto dvou dnů do probíhajícího testování je vyvarovat se možné kontaminace vzorků, které by mohlo později ovlivnit samotný výsledek zkoušky, či kontaminace způsobenou testující osobou. Testováno bylo 5 bakteriálních kmenů, které jsou *Escherichia coli* CCM 4225, *Listeria monocytogenes* CCM 5576, *Proteus vulgaris* CCM 1799, *Salmonella enterica* CCM 4420 a *Staphylococcus aureus* CCM 4227.

V Přílohách 1, 2, 3, 4 a 5 máme zaznamenány průměrné počty bakteriálních kolonií pro vzorek SE MONOLLAURIN OA88729, jejichž celkový výsledek porovnaný s normou ČSN EN ISO 11930 nám poukazuje následující **Tabulka 4**.

Tabulka 4: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLLAURIN OA88729 vůči testovaným bakteriím a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	25.1. 2019	1.2. 2019	8.2. 2019	22.2. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4225	3 x 10 ⁶	≥3	≥2	≥2
<i>Listeria monocytogenes</i> CCM 5576	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Proteus vulgaris</i> CCM 1799	3 x 10 ⁶	≥3	≥3	NI
<i>Salmonella enterica</i> CCM 4420	3 x 10 ⁶	≥3	≥2	≥2
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

- Modrý a následně bílý rámeček naznačují splnění podmínky
- Šedý rámeček poukazuje na nesplnění podmínky

Pro druhý vzorek MONOLLAURIN OA88730, máme počty bakteriálních kolonií zaznamenány v Přílohách 6, 7, 8, 9 a 10 a celkový výsledek můžeme vidět v **Tabulce 5**.

Tabulka 5: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLLAURIN OA88730 vůči testovaným bakteriím a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	25.1. 2019	1.2. 2019	8.2. 2019	22.2. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4225	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Listeria monocytogenes</i> CCM 5576	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Proteus sp.</i> CCM 1799	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Salmonella enterica</i> CCM 4420	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

V **Příloze 1 a 6** jsou zaznamenány průměrné počty kolonií *Escherichia coli*. Podle **Přílohy 1** lze vidět, že počitatelné množství v rozmezí 30-300 podle předpisu normy ČSN EN ISO 11930 se nachází první den v ředění 10⁻² a 10⁻³ sedmý den v ředění 10⁻¹ a 10⁻². 14. den u tohoto vzorku došlo k náhlému přemnožení bakterie po předchozí inhibici. Dosud není známo proč. Druhý vzorek dle **Přílohy 6** měl počitatelné množství pouze v případě prvního dne, a to v ředění 10⁻¹.

Přílohy 2 a 7 jsou věnovány bakterii *Listeria monocytogenes*. Jak lze vidět v **Příloze 2**, počitatelná množství v prvním testovaném dni byly v 10⁻³ a 10⁻⁴. Podle **Přílohy 7** v rámci druhého vzorku byly kolonie v rozmezí již a pouze v ředění 10⁻².

Data z testování bakterie *Proteus vulgaris* se nachází v **Přílohách 3 a 8**. Jak je patrné z **Přílohy 3**, počitatelné množství bylo již v 10⁻¹, to samé platí i pro druhý vzorek, jak nám ukazuje **Příloha 8**.

V **Příloze 4 a 9** jsou zaregistrována data z měření *Salmonella enterica*. Podle **Přílohy 4** lze vidět, že počitatelné množství bylo první a sedmý den v ředění 10⁻¹, nicméně 14. den došlo i u této bakterie k přemnožení po předchozí inhibici, ani zde se neví, co přemnožení způsobilo. Záznam z **Přílohy 9** ukazuje, že druhý vzorek byl počitatelný v ředění 10⁻¹ první a sedmý den.

V **Příloze 5 a 10** jsou zaznamenána data z testování *Staphylococcus aureus*. Podle **Přílohy 5** bylo u této bakterie počítatelné množství v ředění 10^{-3} a 10^{-4} první den, stejně tomu bylo i u druhého vzorku viz **Příloha 10**.

Jak lze vidět, **Tabulka 4**, je věnována účinnosti konzervace 10 % roztoku SE MONOLaurinu OA88729 vůči zmíněným bakteriím a jejich porovnání s kritériem A normy ČSN EN ISO 11930. Vzorek dodaný firmou K2 Pharm s.r.o. nevykazoval žádnou nežádoucí kontaminaci, která by mohla ovlivnit konečné výsledky testování. Záznamy nám tedy poukazují, že ke splnění podmínky normy ČSN EN ISO 11930 došlo u 3 třech testovaných bakterií, konkrétně se jedná o *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris* a *Staphylococcus aureus*. U dvou zbylých bakteriích *Escherichia coli* a *Salmonella enterica* nebyla splněna podmínka inhibice ve 14. a 28. den.

Tabulka 5 nám ukazuje účinnost konzervace 10 % roztoku SE MONOLaurinu OA88729 vůči zmíněným bakteriím a jejich porovnání s kritériem A normy ČSN EN ISO 11930. Ani u tohoto vzorku nebyla zaznamenána žádná kontaminace a z výsledků lze vidět, že tento vzorek vyšel mnohem lépe nežli předchozí, protože ke splnění podmínek došlo u všech zmíněných bakterií.

Escherichia coli je jeden z nejčastěji se vyskytujících komenzálů v lidském tlustém střevě, proto bylo projektem rozhodnuto, že budou tyto dva přípravky ještě testovány s dalšími kmeny této bakterie. Jedná se o kmeny *Escherichia coli* CCM 4517, *Escherichia coli* CCM 2024 a *Escherichia coli* CCM 3954. Ověřování tedy probíhalo od 15. 4. 2019 do 13. 5. 2019 a testovaly se dvě koncentrace, a to 1 % a 10 %.

Počty kolonií z tohoto druhého testování je zaznamenáno v **Přílohách 11 až 16** pro vzorek SE MONOLaurin OA88729, pro druhý testovaný vzorek MONOLaurin OA88730 jsou to **Přílohy 17 až 22**.

V **Příloze 11 a 12** jsou zaznamenána data z testování *Escherichia coli* CCM 4517 při koncentraci 1 % a 10 %. Jak lze vidět z tabulek pro 1% roztok vzorku bylo počítatelné množství v ředění 10^{-1} , pro 10% roztok vzorku bylo množství kolonií menší než stanovené rozmezí.

V **Přílohách 13 a 14** jsou zaznamenány množství kolonií *Escherichia coli* CCM 3954. Lze jdou vidět počítatelná množství pro 1% roztok vzorku už ve dvou ředěních, a to v ředění 10^{-1} a 10^{-2} . Pro 10% roztok vzorku bylo počítatelné množství v ředění 10^{-1} .

Posledním testovaným kmenem této série byla *Escherichia coli* CCM 2024, tu můžeme vidět v **Přílohách 15 a 16**. Ta byla při 1% koncentraci ve stanoveném rozmezí zaznamenána první den v ředění 10^{-1} a 10^{-2} a sedmý den v ředění 10^{-1} . Co se týče druhé 10% koncentrace ta splnila podmínky pouze v ředění 10^{-1} .

V **Přílohách 17 a 18** je zobrazeno množství kolonií *Escherichia coli* CCM 4517 pro druhý vzorek a opět v koncentraci 1 % a 10 %. Zde bylo počítatelné množství podle stanoveného rozmezí zaznamenáno pouze u 1% koncentrace při ředění 10^{-1} .

Další **Přílohy 19 a 20** patří bakteriálnímu kmeni *Escherichia coli* CCM 3954. Zde byl opět zaznamenán nárůst pouze u 1 % roztoku vzorku v prvním dni, a to v ředění 10^{-1} .

V **Přílohách 21 a 22** jsou zaznamenána data testování *Escherichia coli* CCM 2024. Zde bylo počítatelné množství zaznamenáno v obou koncentracích. Pro 1% i 10% koncentraci bylo počítatelné množství pouze v ředění 10^{-1} .

V **Tabulkách 6, 7 a 8, 9** jsou zaznamenána data účinnosti konzervace 1 % a 10 % roztoků obou vzorků vůči zmíněným bakteriálním kmenům *Escherichia coli* a jejich porovnání s kritériem A normy ČSN EN ISO 11930. Ze všech získaných údajů lze vidět, že požadavek inhibice byl zcela splněn, jak v případě prvního vzorku, tak i u druhého vzorku v obou testovaných koncentracích.

Tabulka 6: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % SE MONOLLAURIN OA88729 vůči testovaným *E. coli* a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	15.4. 2019	23.4. 2019	29.4. 2019	13.5. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 2024	3 x 10 ⁶	≥2	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

Tabulka 7: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLLAURIN OA88729 vůči testovaným *E. coli* a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	15.4. 2019	23.4. 2019	29.4. 2019	13.5. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 2024	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

Tabulka 8: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % SE MONOLLAURIN OA88730 vůči testovaným *E. coli* a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	15.4. 2019	23.4. 2019	29.4. 2019	13.5. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 2024	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

Tabulka 9: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % SE MONOLAURIN OA8830 vůči testovaným *E. coli* a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	15.4. 2019	23.4. 2019	29.4. 2019	13.5. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 2024	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

Celkově mohu říct, že oba vzorky nedisponovaly žádnou bakteriální či plísňovou kontaminací, po celkovou dobu testování. Byly oba schopné inhibovat bakterie, které nejsou prospěšné pro střevní mikrobiom a díky těmto testům tedy byla splněna i antimikrobiální ochrana výrobku.

Třetím testovaným vzorkem podle výše zmíněné normy ČSN EN ISO 11930 byl MONOLAURIN SE OA92502 (monolaurin + juglon). Tento vzorek byl testován především na vysoce patogenních klinických kmenech *Escherichia coli*. Prvním kmenem byla *Escherichia coli* CCM 5172, která je původcem zánětu močových cest a druhým testovaným kmenem byla *Escherichia coli* CCM 8874, ta je původcem bakteriémie. Vzorek byl pro obě bakterie testován na tři koncentrace 0,1 %, 1 % a 10 %. Testování probíhalo paralelně od 17. 9. 2019 až do 15. 10. 2019. Během testování nebyla vyzorována žádná nežádoucí bakteriální či plísňová kontaminace. Počty kolonií jsou vyobrazené v **Přílohách 23 až 28**.

V **Přílohách 23, 24 a 25** jsou zobrazená data počtu kolonií z testování *Escherichia coli* CCM 5172. Při koncentraci 0,1 % bylo počítatelné množství zaznamenáno v ředění 10⁻¹ a 10⁻². U koncentrace 1 % bylo počítatelné množství pouze v ředění 10⁻¹. U poslední koncentrace 10 % nedošlo ke splnění vymezeného množství v žádném ředění.

Přílohy 26, 27 a 28 nám poukazují na počty kolonií pro *Escherichia coli* CCM 8874. V prvním dni u 0,1% koncentrace bylo počítatelné množství až v ředění 10⁻² a 10⁻³, to samé platí i pro 1% koncentraci. 0,1% koncentrace byla počítatelná ještě sedmý den v ředění 10⁻¹. U poslední koncentrace 10 % bylo počítatelné rozmezí pouze v ředění 10⁻¹ prvního dne.

V následujících **Tabulkách 10, 11 a 12** jsou souhrnně zaznamenána data účinnosti konzervace 0,1 %, 1 % a 10 % vzorku MONILAURIN SE OA92502 vůči těmto testovaným patogenním *Escherichia coli* CCM 5172 a CCM 8874 a jejich porovnání s kritériem A normy ČSN EN ISO 11930. Z výsledků vychází, že i u tohoto vzorku došlo ke splnění antimikrobiální ochrany výrobku. Dále byla také splněná inhibice i pro nejnižší 0,1 % koncentraci vzorku. A také se ukázalo, že i tento vzorek nedisponuje žádnou nežádoucí bakteriální či plísňovou kontaminací.

Tabulka 10: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 0,1 % MONOLAURIN SE OA92502 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	17.9. 2019	24.9. 2019	1.10. 2019	15.10. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 5172	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 8874	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

Tabulka 11: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % MONOLAURIN SE OA92502 vůči testovaným E. coli a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	17.9. 2019	24.9. 2019	1.10. 2019	15.10. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 5172	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 8874	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

Tabulka 12: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 10 % MONOLaurin SE OA92502 vůči testovaným *E. coli* a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	17.9. 2019	24.9. 2019	1.10. 2019	15.10. 2019
Kritérium A	-	≥3	≥3 a NI	≥3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 5172	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 8874	3 x 10 ⁶	≥3	NI	NI

Posledním vzorkem, který byl testován těmito zátěžovými testy podle zmíněné normy ČSN EN ISO 11930, byl vzorek BETA-AESCIN OA92503. Jeho testování trvalo v období od 4. 6. 2019 do 2. 7. 2019. Testován byl na bakterie *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a *Staphylococcus aureus* CCM 2022 a to ve třech různých koncentracích 0,01 %, 0,1 % a 1 %. I tento vzorek byl zcela čistý a nevykazoval žádnou nežádoucí bakteriální či plísňovou kontaminaci. V **Přílohách 29 až 37** jsou zaznamenány počty kolonií pro tyto výše zmíněné bakterie.

V **Přílohách 29, 30 a 31** jsou znázorněná data z testování *Escherichia coli* CCM 4517. V nejnižší koncentraci 0,01 % bylo počítatelné množství podle rozmezí první den až v ředění 10⁻³, následující týden ještě byl zaznamenán růst v ředění 10⁻¹ a 10⁻². U koncentraci 0,1 % bylo počítatelné množství kolonií pouze první den, a to v ředění 10⁻² a 10⁻³. U nejvyšší koncentraci, tedy 1 %, byly kolonie v daném rozmezí také jenom první den a v ředění 10⁻².

Další **Přílohy 32, 33 a 34** jsou věnovány *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. Při koncentraci 0,01 % prvního dne bylo počítatelné množství v ředění 10⁻³ a v následujícím týdnu byl ještě zaznamenán růst v ředění 10⁻¹. U koncentraci 0,1 % splňovalo určené rozmezí ředění v 10⁻² a 10⁻³. U poslední 1% koncentraci byly počítatelné kolonie již v ředění 10⁻¹ a také v 10⁻².

Poslední testovanou bakterií byl *Staphylococcus aureus* CCM 2022, jehož data jsou vyobrazená v **Přílohách 35, 36 a 37**. První den bylo počítatelné množství pro koncentraci 0,01 % až v ředění 10⁻³ a 10⁻⁴. V případě druhé koncentraci 0,1 % bylo počítatelné množství

již v ředění 10^{-1} . U poslední nejvyšší koncentrace, nebyly zpozorovány žádné tvořící se kolonie a bakterie tedy byla při této koncentraci zcela pohlcena.

V následujících **Tabulkách 13, 14 a 15** jsou poznamenána data účinnosti konzervace 0,01 %, 0,1 % a 1 % vzorku β -AESCIN OA92503 vůči výše zmíněným bakteriím a jejich porovnání s kritériem A normy ČSN EN ISO 11930. Vzorky β -Aescinu se již testovaly v DP Jitky Vackové (2019), kdy byla v těchto vzorcích zjištěna počáteční nežádoucí kontaminace. Díky těmto kontaminacím došlo k opětovnému testování nové šarže vzorku β -Aescinu. Z výsledků lze vyčíst, že produkt nové šarže postupně dokázal inhibovat tyto bakterie při všech stanovených koncentracích a nejlépe z nich vycházela 1% koncentrace. Dále nebyla prokázána žádná vedlejší kontaminace a výsledky svědčí o tom, že byla splněna antimikrobiální ochrana výrobku.

Tabulka 13: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 0,01 % β -Aescinu OA9250 vůči testovaným bakteriálním kmenům a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	4.6. 2019	11.6. 2019	18.6. 2019	2.7. 2019
Kritérium A	-	≥ 3	≥ 3 a NI	≥ 3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3×10^6	≥ 3	NI	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	3×10^6	≥ 3	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	3×10^6	≥ 3	NI	NI

Tabulka 14: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 0,1 % β -Aescinu OA9250 vůči testovaným bakteriálním kmenům a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	4.6. 2019	11.6. 2019	18.6. 2019	2.7. 2019
Kritérium A	-	≥ 3	≥ 3 a NI	≥ 3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3×10^6	≥ 3	NI	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	3×10^6	≥ 3	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	3×10^6	≥ 3	NI	NI

Tabulka 15: Výsledky zkoušek účinnosti konzervace 1 % β -Aescinu OA9250 vůči testovaným bakteriálním kmenům a porovnání těchto výsledků s normou ČSN EN ISO 11930.

Testovaná kultura	Počáteční koncentrace MO KTJ/ml	Počty kolonií v ml přípravku		
		0. den	7. den	14. den
Datum provedení zkoušky	4.6. 2019	11.6. 2019	18.6. 2019	2.7. 2019
Kritérium A	-	≥ 3	≥ 3 a NI	≥ 3 a NI
<i>Escherichia coli</i> CCM 4517	3×10^6	≥ 3	NI	NI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955	3×10^6	≥ 3	NI	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022	3×10^6	≥ 3	NI	NI

3.2 Testování 2 – dle Českého lékopisu (ČSL)

Druhým typem testování v diplomové práci byly zátěžové testy podle ČSL lékopisu, kde se zjišťovaly baktericidní, fungicidní a levurocidní účinky. Tímto postupem byly testovány tři vzorky potenciální náplně enterosolventních tobolek, které mají sloužit jako doplňky stravy. Byly dodány ve formě bílého prášku, a konkrétně se jednalo o MONOLaurin SE, šarže 170719-MS 250 g; náplně tobolek MONOLaurin SE 430 mg, šarže 170519-MS 60ks a náplně tobolek MONOLaurin SE 645 mg, šarže 110519-MS 60ks.

Stejným postupem byly ještě testovány dva vzorky v kapalně podobě, a ty jsou Dezinfekční antimykotický sprej šarže, 150819-MS a Antimikrobiální sprej šarže, 031219-MS.

Nejdříve v této etapě byly testovány pevné práškovité vzorky. Zkoušky probíhaly ve dvou koncentracích, ty byly 1% a 10%. Jako první se testoval baktericidní účinek na 4 bakteriálních kmenech, konkrétně *Enterococcus hirae* CCM 2423, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 a *Staphylococcus aureus* CCM 4516. 10% koncentrace vzorku se testovala 29. 10. 2019 a 1% koncentrace 5. 11. 2019.

Levurocidní účinek byl testován opět ve dvou zmíněných koncentracích, zkoušky obou koncentracích byly v jeden den, a to 12. 11. 2019. Pro tento účinek byla zvolena kvasinka *Candida albicans* CCM 8215. Jako poslední byl zkoumán fungicidní účinek. Zde byly také použity dvě výše zmíněné 1% a 10% koncentrace. Pro tento test byla zvolena plíseň *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 a testovaným dnem pro obě koncentrace byl 27. 11. 2019.

Počty kolonií výše zmíněných mikroorganismů, výsledky kritérií přijatelnosti, a také počty kolonií v kontrolách a validační substanci jsou zaznamenány v následujících **Tabulkách 16 až 27.**

Tabulka 16: Výsledky z testování *Enterococcus hirae* CCM 2423 pro 10 % vzorky monolaurinů

***Enterococcus hirae* CCM 2423**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 10% vodný roztok

29.10. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	189	29	4	3	0
		203	38	1	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	137	26	2	1	0
		159	31	3	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	114	18	5	0	0
		126	21	2	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno
<i>Validační substance</i>		489	Průměr	0,05násobek CFU		
		456	472,5	23,625		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				38	Průměr	
				31	34,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				46	Průměr	
				42	44	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	43	Průměr
					51	47
170519-MS				39	Průměr	
				48	43,5	
110519-MS				35	Průměr	
				27	31	

Tabulka 17: Výsledky z testování *Enterococcus hirae* CCM 2423 pro 1 % vzorky monolaurinů

***Enterococcus hirae* CCM 2423**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	> 300	289	41	5	1
		> 300	291	38	8	1
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	> 300	220	80	18	1
		> 300	238	61	22	2
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	> 300	201	41	5	2
		> 300	198	35	5	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno
<i>Validační substance</i>		536	Průměr	0,05násobek CFU		
		512	524	26,2		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				57	Průměr	
				61	59	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				48	Průměr	
				59	53,6	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	54	Průměr
					56	55
170519-MS				43	Průměr	
				39	41	
110519-MS				38	Průměr	
				29	33,5	

Tabulka 18: Výsledky z testování *Escherichia coli* CCM 4517 pro 10 % vzorky monolaurinů

***Escherichia coli* CCM 4517**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	118	21	10	1	0
		98	29	5	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	89	11	1	0	0
		76	9	3	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	102	28	3	0	0
		115	23	3	3	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno
<i>Validační substance</i>		398	Průměr	0,05násobek CFU		
		416	407	20,35		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				28	Průměr	
				21	24,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				29	Průměr	
				27	28	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	23	Průměr
					22	22,5
170519-MS				19	Průměr	
				22	20,5	
110519-MS				24	Průměr	
				25	24,5	

Tabulka 19: Výsledky z testování *Escherichia coli* CCM 4517 pro 1 % vzorky monolaurinů

***Escherichia coli* CCM 4517**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	> 300	184	28	1	1
		> 300	163	23	4	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	289	112	16	0	0
		257	102	13	2	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	277	121	18	5	1
		293	135	21	6	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno
<i>Validační substance</i>		412	Průměr	0,05násobek CFU		
		449	430,5	21,25		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				48	Průměr	
				51	49,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				41	Průměr	
				43	42	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	38	Průměr
					36	37
				170519-MS	31	Průměr
					33	32
				110519-MS	32	Průměr
					43	37,5

Tabulka 20: Výsledky z testování *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 pro 10 % vzorky monolaurinů

***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	93	8	0	0	0
		89	7	1	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	98	6	0	0	0
		99	6	1	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	71	5	0	0	0
		79	4	1	1	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		337	Průměr	0,05násobek CFU		
		391	364	18,5		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				41	Průměr	
				35	38	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				31	Průměr	
				39	35	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	42	Průměr
					39	40,5
170519-MS				41	Průměr	
				41	41	
110519-MS				34	Průměr	
				29	31,5	

Tabulka 21: Výsledky z testování *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 pro 1 % vzorky monolaurinů

***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	256	68	17	2	0
		234	71	18	3	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmickeho snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	191	69	19	0	0
		176	61	15	1	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmickeho snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	198	57	9	1	0
		201	42	11	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmickeho snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno
<i>Validační substance</i>		287	Průměr	0,05násobek CFU		
		318	302,5	15,125		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				39	Průměr	
				48	43,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				51	Průměr	
				47	49	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	42	Průměr
					31	36,5
170519-MS				20	Průměr	
				23	21,5	
110519-MS				19	Průměr	
				27	23	

Tabulka 22: Výsledky z testování *Staphylococcus aureus* CCM 4516 pro 10 % vzorky monolaurinů

***Staphylococcus aureus* CCM 4516**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	85	3	1	0	0
		89	6	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	96	5	1	0	0
		95	6	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

29.10.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	89	3	0	0	0
		91	3	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		417	Průměr	0,05násobek CFU		
		388	402,5	20,125		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				61	Průměr	
				57	59	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				54	Průměr	
				53	53,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	36	Průměr
					39	37,5
170519-MS				34	Průměr	
				37	35,5	
110519-MS				29	Průměr	
				27	28	

Tabulka 23: Výsledky z testování *Staphylococcus aureus* CCM 4516 pro 1 % vzorky monolaurinů

***Staphylococcus aureus* CCM 4516**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	> 300	247	58	10	5
		> 300	226	61	6	3
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	> 300	222	58	2	2
		> 300	198	56	7	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

5.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5*10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	> 300	115	49	3	0
		> 300	121	53	4	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno	nesplněno
<i>Validační substance</i>		435	Průměr	0,05násobek CFU		
		402	418,5	20,925		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				49	Průměr	
				58	53,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				45	Průměr	
				44	43	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	61	Průměr
					56	58,5
170519-MS				54	Průměr	
				56	55	
110519-MS				41	Průměr	
				34	37,5	

Tabulka 24: Výsledky z testování *Candida albicans* CCM 8215 pro 10 % vzorky monolaurinů

***Candida albicans* CCM 8215**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 10% vodný roztok

12.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	97	6	1	0	0
		91	3	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

12.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	88	9	0	0	0
		94	8	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

12.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	91	8	0	0	0
		99	7	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		326	Průměr	0,05násobek CFU		
		387	356,5	17,825		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				41	Průměr	
				35	38	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				29	Průměr	
				26	27,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	16	Průměr
				20	18	
170519-MS				18	Průměr	
				21	19,5	
110519-MS				18	Průměr	
				22	20	

Tabulka 25: Výsledky z testování *Candida albicans* CCM 8215 pro 1 % vzorky monolaurinů

***Candida albicans* CCM 8215**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 1% vodný roztok

12.11. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	83	6	0	0	0
		89	3	1	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

12.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	95	7	0	0	0
		91	6	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

12.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	91	5	0	0	0
		99	3	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		326	Průměr	0,05násobek CFU		
		387	356,5	17,825		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				41	Průměr	
				35	38	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				29	Průměr	
				26	27,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	29	Průměr
					38	33,5
170519-MS				31	Průměr	
				39	35	
110519-MS				32	Průměr	
				40	36	

Tabulka 26: Výsledky z testování *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 pro 10 % vzorky monolaurinů

***Aspergillus brasiliensis* CCM 8222**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 10% vodný roztok

27.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicidní suspenze	Počet CFU/ml	104	22	5	0	0
		97	15	5	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

27.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicidní suspenze	Počet CFU/ml	128	8	1	0	0
		121	18	1	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

27.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicidní suspenze	Počet CFU/ml	97	17	3	0	0
		85	24	3	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		223	Průměr	0,05násobek CFU		
		203	213	10,65		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				12	Průměr	
				14	13	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				22	Průměr	
				21	21,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	20	Průměr
				18	19	
170519-MS				14	Průměr	
				18	16	
110519-MS				17	Průměr	
				13	15	

Tabulka 27: Výsledky z testování *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 pro 1 % vzorky monolaurinů

***Aspergillus brasiliensis* CCM 8222**

MONOLAURIN SE, šarže 170719-MS 250 g, 1% vodný roztok

27.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicitní suspenze	Počet CFU/ml	117	13	5	0	0
		99	22	1	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 430 mg, šarže 170519-MS 60 ks, 1% vodný roztok

27.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicitní suspenze	Počet CFU/ml	123	16	1	0	0
		119	10	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno

MONOLAURIN SE 645 mg, šarže 110519-MS 60 ks, 10% vodný roztok

27.11.2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicitní suspenze	Počet CFU/ml	103	19	3	0	0
		100	16	3	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		223	Průměr	0,05násobek CFU		
		203	213	10,65		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				12	Průměr	
				14	13	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				22	Průměr	
				21	21,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				170719-MS	10	Průměr
					15	12,5
				170519-MS	18	Průměr
					9	13,5
				110519-MS	16	Průměr
					13	14,5

Podmínkou pro splnění antiseptických účinků přípravku bylo, aby došlo k poklesu počtu CFU o 5 log pro baktericidní účinek, dále o 4 log pro levurocidní a fungicidní účinek.

Z výše zmíněných výsledků lze vidět, že k požadovanému poklesu pro baktericidní účinek touto metodou nedošlo u žádné 1% koncentrace vzorků. Nicméně snížení u *Enterococcus hirae* nenastalo ani v případě 10% koncentrace. U *Escherichia coli* došlo k poklesu v rámci 10% koncentrace pouze u jediného vzorku a tím je MONOLaurin SE 430 mg, šarže 170519-MS. V případě *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* byl dosažen požadovaný pokles o 5 log u 10% koncentrace vzorků MONOLaurin SE, šarže 170719-MS 250 g; náplně tobolek MONOLaurin SE 430 mg, šarže 170519-MS 60ks a náplně tobolek MONOLaurin SE 645 mg, šarže 110519-MS 60ks.

Levurocidní účinek, který byl testován pouze na kvasince *Candida albicans*, obstál požadovanému poklesu o 4 log jak u 1% ale také i u 10% koncentrace vzorků MONOLaurin SE, šarže 170719-MS 250 g; náplně tobolek MONOLaurin SE 430 mg, šarže 170519-MS 60ks a náplně tobolek MONOLaurin SE 645 mg, šarže 110519-MS 60ks.

Fungicidní účinek se testoval na plísní *Aspergillus brasiliensis*, u které také došlo k požadovanému logaritmickému snížení o 4 log u obou koncentrací vzorků MONOLaurin SE, šarže 170719-MS 250 g; náplně tobolek MONOLaurin SE 430 mg, šarže 170519-MS 60ks a náplně tobolek MONOLaurin SE 645 mg, šarže 110519-MS 60ks.

Celkově lze říct, že testování přípravků vyšlo velice pozitivně. Ani u jednoho vzorku z této série nebyla zaznamenána žádná nežádoucí kontaminace. Sice nebyla splněna baktericidní účinnost pro *Enterococcus hirae* a *Escherichia coli*, nicméně obě tyto bakterie jsou součástí lidského mikrobiomu střev, tudíž jejich redukce není natolik důležitá. Na druhou stranu bylo potřeba splnit podmínky pro patogenní zástupce bakteriální mikroflóry, tedy pro *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, a ty byly splněny. Levurocidní účinek byl také prokázán na patogenní kvasince *Candida albicans* a co se týče fungicidního účinku i ten splnil podmínky u mikroskopické vláknité houby *Aspergillus brasiliensis*.

Prvním testovaným kapalným vzorkem byl Desinfekční sprej, šarže 150819-MS, ten byl testován dne 11. 12. 2019. K testování byly použity stejné kmeny jako v případě pevných vzorků, tedy *Enterococcus hirae* CCM 2423, *Escherichia coli* CCM 4517, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 a *Staphylococcus aureus* CCM 4516 pro baktericidní účinek, *Candida albicans* CCM 8215 pro levurocidní účinek a *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 pro fungicidní účinek. Testovaný vzorek nebyl nijak ředěn. Veškeré záznamy a jejich výsledky jsou zapsány v **Přílohách 38 až 43**.

Druhým testovaným vzorkem byl Antimikrobiální sprej, šarže 031219-MS, jehož pracovní název zní CLEAN sprej. Tento přípravek byl testován na stejné mikroorganismy, jako výše zmíněný Desinfekční sprej, šarže 150819-MS. Zkoušky probíhaly v podobě dvou koncentrací, 30% a 50%. Fungicidní účinek se testoval 10. 1. 2020, levurocidní účinek 13. 1. 2020 a nakonec se testoval baktericidní účinek 14. 1. 2020. Všechna data a výsledky zkoušky jsou zapsána v **Přílohách 44 až 55**. Složení tohoto zkoumaného přípravku je popsáno v následující **Tabulce 28**.

Tabulka 28: Složení Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS

Použité látky	Množství
Glyceryl laurát MONOMULS 90 L12	1,000 g
Glyceryl undecylenát DUB MUG	1,000 g
Kyselina laurová	0,100 g
Dekaglyceryl laurát POEM J -0021	0,500 g
Polyglycerol-3	2,000 g
Isopropanol	70,000g
Voda čištěná	do 100,000 g

U prvního vzorku Desinfekční sprej, šarže 150819-MS nebyl zaznamenán žádný nárůst testovaných mikroorganismů či nežádoucí kontaminace v testované ředící řadě. U druhého vzorku Antimikrobiální sprej, šarže 031219-MS, také nebyl zaznamenán nárůst zkoušených mikroorganismů či nežádoucí kontaminace v obou vybraných koncentracích, kromě 30% koncentrace u *Aspergillus brasiliensis*, nicméně průměr kolonií byl pod stanovené rozmezí 15 až 150. Celkově obě dezinfekce splnily požadavky Českého lékopisu.

4 Závěr

- Testovaný přípravek SE MONOLaurin OA88729 vyhověl požadavkům kritéria A normy ČSN EN ISO 11930 jen částečně, u 10% vodných roztoků *Escherichia coli* CCM 4225 a *Salmonella enterica* CCM 4420 došlo po 14 dnech znovu k namnožení zmíněných bakterií. Nicméně u dalších třech testovaných kmenů *Escherichia coli*, které reprezentují klinické izoláty došlo k požadovanému logaritmickeému snížení podle normy ČSN EN ISO 11930 v 1% i 10% koncentraci.
- Vzorek SE MONOLaurin OA88730 vyhověl požadavkům kritéria A normy ČSN EN ISO 11930 v testovaných 10% koncentracích na různé bakteriální kmeny, posléze i v 1% a 10% koncentraci na klinické izoláty kmene *Escherichia coli*.
- Další testovaný přípravek MONOLaurin SE OA92502, který byl testován na vysoce patogenní kmeny *Escherichia coli* v 0,1%; 1% a 10% koncentraci vyhověl požadavkům kritéria A normy ČSN EN ISO 11930 i v nejnižší testované koncentraci.
- Vzorek BETA-AESCIN OA92503, který byl testován na 3 bakteriální kmeny v 0,01%; 0,1% a 1% koncentraci také v tomto testování obstál i při nejnižší koncentraci a splnil podmínky normy ČSN EN ISO 11930. Opětné testování nové šarže β -Aescinu vyplynulo z předchozí DP Jitky Vackové (2019), kde byly zjištěny počáteční kontaminace vzorků.
- Vzorky MONOLaurin SE, šarže 170719-MS 250 g; náplně tobolek MONOLaurin SE 430 mg, šarže 170519-MS 60ks a náplně tobolek MONOLaurin SE 645 mg, šarže 110519-MS 60ks byly testované podle Českého lékopisu. Testovaly se baktericidní, levurocidní a fungicidní účinky. Levurocidní i fungicidní účinky vyšly velmi dobře, byly potvrzené v obou testovaných 1% a 10% koncentracích. Baktericidní účinnost se projevila pouze v 1% koncentraci u *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus*, které zde zastupovaly patogenní bakterie. U *Enterococcus hirae* a *Escherichia coli* nebyla naplněna podmínka, nicméně musíme vzít v potaz, že tyto kmeny jsou součástí lidského mikrobiomu a tudíž jejich snížení není natolik důležité jako je snížení u jiných potenciálních patogenních bakterií.
- Z veškerých testovaných přípravků na bázi monolaurinu připravených ve firmě K2 Pharm s.r.o. se sídlem v Opavě se rozhodovalo mezi posledními třemi vzorky, které z mikrobiologického hlediska byly na stejné úrovni. Po zhodnocení disolučních testů provedených ve společnosti VÚOS, dalšího řešitele projektu TAČR TH02010762, byl vybrán právě vzorek: náplně tobolek MONOLaurin SE 430 mg, díky jeho

rozpustnosti. Výsledkem řešení celého projektu TAČR TH02010762 je užitečný vzor číslo 319 73 - Doplněk stravy pro příznivé ovlivnění lidského střevního mikrobiomu.

- Pro dosažení maximálních účinků na lidský střevní mikrobiom je doporučeno kombinované užívání potravinových doplňků obsahující monolaurin, β -Aescin, vitamin A a laktoferin. V současnosti je již na trhu dostupný výrobek s obchodním názvem Monolaurin Essens, obsahující kombinaci monolaurinu a vitamínu A.
- Testované přípravky Dezinfekční antimykotický sprej šarže, 150819-MS a Antimikrobiální sprej šarže, 031219-MS testované podle Českého lékopisu splnily podmínky kritérií. Antimikrobiální sprej šarže, 031219-MS byl vybrán k dalším testům a možné výrobě pod pracovním názvem CLEAN sprej.

5 Použitá literatura

1. **Aidy SE, van den Bogert B, Kleerebezem M**, *The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health*, Curr Opin Biotechnol, 2015, **32**, 14-20.
2. **Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C**, *Escherichia coli in Europe: An Overview*, Int J Environ Res Public Health, 2013, 10(**12**), 6235-6254.
3. **Al-Wrafiy F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A**, *Pathogenic factors of Pseudomonas aeruginosa – the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy*, Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71(**0**), 78-91.
4. **Amon P, Sanderson I**, *What is the microbiome?* Arch Dis Child Educ Prac Ed, 2017, 102(**5**), 257-260.
5. **Azam MW, Khan AU**, *Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa*, Drug Discov Today, 2019, 24 (**1**), 350-359.
6. **Bartáková H, Cetkovský P, Drgoňa L, Haber J, Hamal P et al.**, *Invazivní aspergilóza: současné možnosti diagnostiky*, Vnitř Lék, 2007, 53(**Suppl**), 1-36.
7. **Belizário JE, Faintuch J, Garay-Malpartida M**, *Gut Microbiome Dysbiosis and Immunometabolism: New Frontiers for Treatment of Metabolic Diseases*. Mediators Inflamm. 2018, **2018**, 1-12.
8. **Blum HE**, *The human microbiome*. Adv Med Sci, 2017, 62(**2**), 414-420.
9. **Brandt SL, Putnam NE, Cassat JE, Serezani CH**, *Innate immunity to S. aureus: evolving paradigms in soft tissue and invasive infections*. J Immunol. 2019, 200(**12**), 3871-3880.
10. **Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA**, *The human skin microbiome*. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(**3**), 143-155.
11. **Carvalho F, Sousa S, Cabanes D**, *How Listeria monocytogenes organizes its surface for virulence*, Front Cell Infect Microbiol, 2014, 4(**48**), 1-21.
12. **Cong J, Zhang X**, *How human microbiome talks to health and disease*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 37(**9**), 2018, 1595-1601.
13. **Cordonnier Ch, Etienne-Mesmin L, Thévenot J, Rougeron A et al.**, *Enterohemorrhagic Escherichia coli pathogenesis: role of Long polar fimbriae in Peyer's patches interactions*, Sci Rep, 2017, 7(**44655**), 1-14.

14. **Český lékopis 2017 - Doplněk 2018 (ČL 2017 - Dopl. 2018):** *Pharmacopoea Bohemica MMXVII-Addendum MMXVIII (Ph. B. MMXVII-Add. MMXVIII)*. 2018. Praha: Grada, ISBN: 978-80-271-0858-9, 1496 stran.
15. **ČSN EN ISO 11930.** *Kosmetika-Mikrobiologie-Hodnocení antimikrobiální ochrany kosmetického výrobku*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2019, 1-36, Třídící znak 681561, Katalogové číslo 507423.
16. **D'Argenio V, Salvatore F,** *The role of the gut microbiome in the healthy adult status*, Clin Chim Acta, 2015, 451(Pt A), 97-102.
17. **Deker J, Frank K,** *Salmonella, Shigella a Yersinia*, Clin Lab Med, 35(2), 225-246.
18. **Di Lodovico S, Cataldi V, Di Campi E, Ancarani E et al.,** *Enterococcus hirae biofilm formation on hospital material surfaces and effect of new biocides*, Environ Health Prev Med, 2017, 22(63), 1-7.
19. **Di Pilato V, Freschi G, Ringressi MN, Pallecchi L et al.,** *The esophageal microbiota in health and disease*, Ann N Y Acad Sci, 2016, 1381(1), 21-33.
20. **Dubreuil JD,** *Enterotoxigenic Escherichia coli targeting intestinal epithelial tight junctions: An effective way to alter the barrier integrity*. Microb Patholog, 2017, **113**, 129-134.
21. **Dufour M, Manson JM, Bremer PH, Dufour JP et al.,** *Characterization of Monolaurin Resistance in Enterococcus faecalis*, Appl Environ Microbiol, 2007, 73(17), 5507-5515.
22. **Dugas LR, Lie L, Plange-Rhule J, Bedu-Addo K et al.,** *Gut microbiota, short chain fatty acids, and obesity across the epidemiologic transition: the METS-Microbiome study protocol*. BMC Public Health, 2018, 18(1), 1-10.
23. **Frías-De-Leon MG, Rosas-De Paz E, Arenas R, Atoche C et al.,** *Identification of Apergillus tubingensis in a primary skin*, J Mycol Med, 2018, 28(2), 274-278.
24. **Gallelli L,** *Escin: a review of its anti-edematous, anti-inflammatory, and venotonic properties*, Drug Des Devel Ther, 2019, **13**, 3425-3437.
25. **García-Solache M, Rice LB,** *The Enterococcus: a model of Adaptability to Its Enviroment*, Clin Microbiol Rev, 2019, 32(2), 1-28.
26. **Geisler R, Dargel C, Hellweg T,** *The Biosurfactant β -Aescin: A Review on the Physico-Chemical Properties and its Interaction with Lipid Model Membranes and Langmuir Monolayers*, Molecules, 2020, 25(117), 1-22.
27. **Gholizadeh P, Eslami H, Yousefi M, Asgharzadeh M et al.,** *Role of oral microbiome on oral cancers, a review*. Biomed Pharmacother, 2016, **84**, 552-558.

28. **Gil D, Shuvaerv S, Frank-Kamenetskii A, Reukov V et al.,** *Novel Antibacterial Coating on Orthopedic Wires To Eliminate Pin Tract Infections*, *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(7), 1-14.
29. **Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BES et al.,** *Diarrheagenic Escherichia coli*, *Braz J Microbiol*, 2016, 47(S1), 3-30.
30. **Gorkiewicz G, Moschen A,** *Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease*. *Virchows Arch*. 2018, 472(1), 159–172.
31. **Hamilton AL, Kamm MA, Ng SC, Morrison M,** *Proteus spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens*, *Clin Microbiol Rev*, 2018, 31(3), 1-19.
32. **Han X, Zhu G, Ding Y, Miao Y et al.,** *Selective catalytic synthesis of glycerol monolaurate over silica gel-based sulfonic acid functionalized ionic liquid catalysts*, *Chem Eng J*, 2019, 359, 733-745.
33. **Hernandez-Milian A, Payeras-Cifre A,** *What is New in Listeriosis?* *Biomed Res Int*, 2014, 2014, 1-7.
34. **Hunt RH, Camilleri M, Crowe SE, El-Omar EM et al.,** *The stomach in health and disease*, *Gut*, 2015, 64(10), 1650-1668.
35. **Chambers HF, Deleo FR,** *Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era*, *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9), 629-641.
36. **Chen YE, Fischbach MA, Belkaid Y,** *Skin microbiota-host interactions*, *Nature*, 2018, 553(7689):427–436.
37. **Chinatangkul N, Limmatvapirat Ch, Nunthanid J, Luangtana-Anan M et al.,** *Design and characterization of monolaurin loaded electrospun shellac nanofibers with antimicrobial activity*, *Asian J Pharm Sci*, 2018, 13(5), 459-471.
38. **Chlebicz A, Ślizewska K,** *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review*, *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15(5), 1-29.
39. **Ianiro G., Molina-Infante J, Gasbarrini A,** *Gastric Microbiota*, *Helicobacter*, 2015, 20(S1), 68-71.
40. **Kilian M,** *The oral microbiome – friend or foe?* *Eur J Oral Sci*, 2018, 126(S1), 5-12.
41. **Kong C, Neoh HM, Nathan S,** *Targeting Staphylococcus aureus Toxins: A potential form of Anti-Virulence Therapy*, *Toxins (Basel)*, 2016, 8(3), 1-21.
42. **Kovanda L, Zhang W, Wei Y, Luo J et al.,** *In Vitro Antimicrobial Activities of Organic Acids and Their Derivates on Several Species of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria*, *Molecules.*, 2019, 24(20):3770, 1-14.

43. **Krishnan K, Chen T, Paster BJ**, *A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease*, Oral Dis, 2017, 23(3), 276-286.
44. **Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB**, *Salmonella infection: interplay between the bacteria and host immune system*. Immunol Lett, 2017, **190**, 42-50.
45. **Lamas A, Miranda JM, Regal P, Vázquez B et al.**, *A comprehensive review of non-enterica subspecies of Salmonella enterica*, Microbiol Res, 2018, **206**, 60-73.
46. **Li B, Wang Z, Xie JM, Wang G et al.**, *TIGAR knockdown enhanced the anticancer effect of aescin via regulating autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells*, Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(1), 111-121.
47. **Lieberman S, Enig MG, Preuss HG**, *A Review of Monolaurin and Lauric Acid: Natural Virucidal and Bactericidal Agents*, Alternative Compl Ther, 2006, 12(6), 310-314.
48. **Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C**, *The healthy human microbiome*. Genome Med. 2016, 8(51), 1-11.
49. **Magnúsdóttir S, Thiele I**, *Modeling metabolism of the human gut microbiome*. Curr Opin Biotechnol, 2018, **51**, 90-96.
50. **Mainil J**, *Escherichia coli virulence factors*, Vet Immunol Immunopathol, 2013, 152(1-2), 2-12.
51. **Malla MA, Dubey A, Kumar A, Yadav S et al.**, *Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment*. Front Immunol. 2019, 9(2868), 1-23.
52. **Markou P, Apidianakis Y**, *Pathogenesis of intestinal Pseudomonas aeruginosa infection in patients with cancer*. Front Cell Infect Microbiol, 2014, 3(115), 1-5.
53. **Markowiak P, Śliżewska K**, *Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health*. Nutrients. 2017, 9(9), 1-30.
54. **Mayer FL, Wilson D, Hube B**, *Candida albicans pathogenicity mechanisms*, Virulence, 2013, 4(2), 119-128.
55. **Mirhoseini A, Amani J, Nazarian S**, *Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic Escherichia coli and vaccines against it*. Microb. Pathog, 2018, **117**, 162-169.
56. **Mo Q, Fu A, Deng L, Zhao M et al.**, *High-dose Glycerol Monolaurate Up-Regulated Beneficial Indigenous Microbiota without Inducing Metabolic Dysfunction and Systemic Inflammation: New Insights into Its Antimicrobial Potential*, Nutrients, 2019, 11(9):1981, 1-17.

57. **Monaco M, Pimentel de Araujo F, Crusiani M, Coccia EM, Pantosti A**, *Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of Staphylococcus aureus*, *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, **409**, 21-56.
58. **Nobile CJ, Johnson AD**, *Candida albicans Biofilms and Human Disease*, *Annu Rec Microbiol*, 2015, **69**, 71-92.
59. **Nyarko EB, Donnelly CW**, *Listeria monocytogenes: Strain Heterogeneity, Methods, and Challenges of Subtyping*. *J Food Sci*, 2015, 80(**12**), 2868-2878.
60. **Oh JH, Cho AY, Kim YS, Lee KY, Sun IO**, *A Rare Case of Urinary Tract Infection Caused by Enterococcus hirae in and Eldery Man with Benign Prostate Hyperplasia*, *Chonnam Med J*, 2019, 55(**3**), 177-178.
61. **Oliveira D, Borges A, Simões M**, *Staphylococcus aureus Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases*, *Toxins (Basel)*, 2018, 10(**6**), 1-19.
62. **Pinkes ME, White C, Wong CS**, *Native-valve Enterococcus hirae endocarditis: a case report and review of the literature*. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(**891**), 2-5.
63. **Radoshevich L, Coccart P**, *Listeria monocytogenes: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis*. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(**1**), 32-46.
64. **Raksha, Singh G, Urhekar AD**, *Virulence Factors Detection in Aspergillus Isolates from Clinical and Environmental Samples*, *J Clin Diagn Res*, 2017, 11(**7**), DC13-DC18.
65. **Rodulfo H, Arcia A, Hernández A, Micheli E et al.**, *Virulence factors and integrons are associated with MDR aXDR phenotypes in nosocomial strains of Pseudomonas aeruginosa in a Venezuelan university hospital*, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2019, 61(**e20**), 1-11.
66. **Seleem D, Chen E, Benso B, Pardi V, Murata RM**, *In vitro evaluation of antifungal activity of monolaurin against Candida albicans biofilms*, *PeerJ.*, 2016, 4(**e2148**), 1-17.
67. **Setianto WB, Wibowo TY, Yohanes H, Illaningtyas F, Anggoro DD**, *Synthesis of glycerol mono-laurate from lauric acid and glycerol for food antibacterial additive*, *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 2017, 65(**1**):012046, 1-7.
68. **Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D et al.**, *Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies*, *J App Microbiol*, 2016, 121(**2**), 309-319.
69. **Schlievert PM, Kilgore SH, Kaus GM, Ho TD, Ellermeier CD**, *Glycerol Monolaurate (GML) and a Nonaqueous Five-Percent GML Gel Kill Bacillus and Clostridium Spores*, *mSphere*, 2018, 3(**6**), 1-9.
70. **Schlievert PM, Peterson ML**, *Glycerol Monolaurate Antibacterial Activity in Broth and Biofilm Cultures*, *PLoS One*, 2012, 7(**7**), 1-12.

71. **Schommer NN, Gallo RL**, *Structure and function of the human skin microbiome*, Trends Microbiol., 2013, 21(12), 660-668.
72. **Stenutz R, Weintraub A, Wildmalm G**, *The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens*, FEMS Microbiol Rev, 2006, 30(3), 382-403.
73. **Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ**, *Aspergillus fumigatus and Related species*, Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 5(2), 1-17.
74. **Tam K, Torres VJ**, *Staphylococcus aureus Secreted Toxins & Extracellular Enzymes*, Microbiol Spectr, 2019, 7(2), 1-59.
75. **Thomer L, Schneewind O, Missiakas D**, *Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections*, Annu Rev Pathol, 2016, 11, 343-364.
76. **Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr**, *Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management*, Clin Microbiol Rev. 2015, 28(3), 603–661.
77. **Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA**, *Pathogenesis of Candida albicans biofilm*, Pathog Dis, 2016, 74(4), 1-13.
78. **Umerska A, Cassisa V, Bastiat G, Matougui N**, *Synergistic interactions between antimicrobial peptides derived from plectasin and lipid nanocapsules containing monolaurin as a cosurfactant against Staphylococcus aureus*, Int J Nanomedicine, 2017, 12, 5687-5699.
79. **Vacková J**. *Suplementy na bázi přírodních látek pro pozitivní ovlivnění lidského mikrobiomu*, Pardubice 2019, Diplomová práce, Univerzita Pardubice, fakulta chemicko-technologická.
80. **Verma D, Garg PK, Dubey AK**, *Insights into the human oral microbiome*, Arch Microbiol, 2018, 200(4), 525-540.
81. **Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U et al.**, *Escherichia coli: an old friend with new tidings*. FEMS Microbiol Rev, 2016, 40(4), 437-463.
82. **Wasiński B**, *Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli – threat connected with food-borne infections*, Ann Agric Environ Med, 2019, 26(4), 532-537.
83. **Yadav M, Verma MK, Chauhan NS**, *A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition*, Arch Microbiol, 2018, 200(2), 203-217.
84. **Yang Sch, Lin ChH, Aljuffali IA, Fang JY**, *Current pathogenic Escherichia coli foodborne outbreak cases and therapy development*, Arch Microbiol, 2017, 199(6), 811-825.

85. **Zhang MS, Sandouk A, Houtmaa JCD**, *Glycerol monolaurate (GML) inhibits human T cell signaling and function by disrupting lipid dynamics*, *Sci Rep*, 2016, 6(**30225**), 1-13.

6 Přílohy

Příloha 1: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729 ..98	98
Příloha 2: Průměrný počet kolonií <i>L. monocytogenes</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729.....98	98
Příloha 3: Průměrný počet kolonií <i>P. vulgaris</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729 ..98	98
Příloha 4: Průměrný počet kolonií <i>S. enterica</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729 ..98	98
Příloha 5: Průměrný počet kolonií <i>S. aureus</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729 ..99	99
Příloha 6: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730 ..99	99
Příloha 7: Průměrný počet kolonií <i>L. monocytogenes</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730.....99	99
Příloha 8: Průměrný počet kolonií <i>P. vulgaris</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730 ..99	99
Příloha 9: Průměrný počet kolonií <i>S. enterica</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730 ..100	100
Příloha 10: Průměrný počet kolonií <i>S. aureus</i> v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730.....100	100
Příloha 11: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> CCM 4517 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729.....100	100
Příloha 12: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> CCM 4517 v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729.....100	100
Příloha 13: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> CCM 3954 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729.....101	101
Příloha 14: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> CCM 3954 v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729.....101	101
Příloha 15: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> CCM 2024 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729.....101	101
Příloha 16: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> CCM 2024 v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729.....101	101
Příloha 17: Průměrný počet kolonií <i>E. coli</i> CCM 4517 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730.....102	102

Příloha 18: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 4517 v 10 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730.....	102
Příloha 19: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 3954 v 1 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730.....	102
Příloha 20: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 3954 v 10 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730.....	102
Příloha 21: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 2024 v 1 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730.....	103
Příloha 22: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 2024 v 1 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730.....	103
Příloha 23: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 5172 v 0,1 % vzorku MONOLAUURIN SE OA92502.....	103
Příloha 24: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 5172 v 1 % vzorku MONOLAUURIN SE OA92502.....	103
Příloha 25: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 5172 v 10 % vzorku MONOLAUURIN SE OA92502.....	104
Příloha 26: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 8874 v 0,1 % vzorku MONOLAUURIN SE OA92502.....	104
Příloha 27: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 8874 v 1 % vzorku MONOLAUURIN SE OA92502.....	104
Příloha 28: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 8874 v 10 % vzorku MONOLAUURIN SE OA92502.....	104
Příloha 29: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 4517 v 0,01 % vzorku β-AESCIN OA92503	105
Příloha 30: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 4517 v 0,1 % vzorku β-AESCIN OA92503	105
Příloha 31: Průměrný počet kolonií E. coli CCM 4517 v 1 % vzorku β-AESCIN OA92503	105
Příloha 32: Průměrný počet kolonií P. aeruginosa CCM 3955 v 0,01 % vzorku β-AESCIN OA92503.....	105
Příloha 33: Průměrný počet kolonií P. aeruginosa CCM 3955 v 0,1 % vzorku β-AESCIN OA92503.....	106
Příloha 34: Průměrný počet kolonií P. aeruginosa CCM 3955 v 1 % vzorku β-AESCIN OA92503.....	106

Příloha 35: Průměrný počet kolonií <i>S. aureus</i> CCM 2022 v 0,01 % vzorku β-AESCIN OA92503.....	106
Příloha 36: Průměrný počet kolonií <i>S. aureus</i> CCM 2022 v 0,1 % vzorku β-AESCIN OA92503.....	106
Příloha 37: Průměrný počet kolonií <i>S. aureus</i> CCM 2022 v 1 % vzorku β-AESCIN OA92503	107
Příloha 38: Výsledky z testování <i>Enterococcus hirae</i> CCM 2423 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS	107
Příloha 39: Výsledky z testování <i>Escherichia coli</i> CCM 4517 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS	108
Příloha 40: Výsledky z testování <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS	108
Příloha 41: Výsledky z testování <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS	109
Příloha 42: Výsledky z testování <i>Candida albicans</i> CCM 8215 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS	109
Příloha 43: Výsledky z testování <i>Aspergillus brasiliensis</i> CCM 8222 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS	110
Příloha 44: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Enterococcus hirae</i> CCM 2423	110
Příloha 45: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Escherichia coli</i> CCM 4517	111
Příloha 46: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961.....	111
Příloha 47: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	112
Příloha 48: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Candida albicans</i> CCM 8215.....	112
Příloha 49: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Aspergillus brasiliensis</i> CCM 8222.....	113
Příloha 50: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Enterococcus hirae</i> CCM 2423	113
Příloha 51: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Escherichia coli</i> CCM 4517	114

Příloha 52: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 1961.....	114
Příloha 53: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4516	115
Příloha 54: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Candida albicans</i> CCM 8215.....	115
Příloha 55: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na <i>Aspergillus brasiliensis</i> CCM 8222.....	116

Příloha 1: Průměrný počet kolonií *E. coli* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88729

Escherichia coli CCM 4225, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
25.1. 2019	1. den	Nepočítatelný	281	35	6	1
1.2. 2019	7. den	75	34	1	0	0
8.2. 2019	14. den	Nepočítatelný	> 300	97	16	2
15.2. 2019	21. den	> 300	293	69	8	3
22.2. 2019	28. den	256	163	51	0	0

Příloha 2: Průměrný počet kolonií *L. monocytogenes* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88729

Listeria monocytogenes CCM 5576, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
25.1. 2019	1. den	> 300	> 300	158	37	8
1.2. 2019	7. den	0	0	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 3: Průměrný počet kolonií *P. vulgaris* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88729

Proteus vulgaris CCM 1799, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
25.1. 2019	1. den	72	11	2	0	0
1.2. 2019	7. den	12	1	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 4: Průměrný počet kolonií *S. enterica* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88729

Salmonella enterica CCM 4420, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
25.1. 2019	1. den	89	13	4	1	0
1.2. 2019	7. den	43	19	3	0	0
8.2. 2019	14. den	Nepočítatelný	239	22	9	0
15.2. 2019	21. den	Nepočítatelný	> 300	86	6	3
22.2. 2019	28. den	294	139	18	0	0

Příloha 5: Průměrný počet kolonií *S. aureus* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88729

<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
25.1. 2019	1. den	Nepočítatelný	> 300	221	46	11
1.2. 2019	7. den	6	1	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 6: Průměrný počet kolonií *E. coli* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88730

<i>Escherichia coli</i> CCM 4225, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
25.1. 2019	1. den	92	16	3	0	0
1.2. 2019	7. den	18	2	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 7: Průměrný počet kolonií *L. monocytogenes* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88730

<i>Listeria monocytogenes</i> CCM 5576, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
25.1. 2019	1. den	> 300	121	22	8	4
1.2. 2019	7. den	0	0	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 8: Průměrný počet kolonií *P. vulgaris* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88730

<i>Proteus vulgaris</i> CCM 1799, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
25.1. 2019	1. den	82	12	1	0	0
1.2. 2019	7. den	0	0	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 9: Průměrný počet kolonií *S. enterica* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88730

<i>Salmonella enterica</i> CCM 4420, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
25.1. 2019	1. den	40	4	2	1	0
1.2. 2019	7. den	37	10	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 10: Průměrný počet kolonií *S. aureus* v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88730

<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 4227, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
25.1. 2019	1. den	Nepočítatelný	> 300	189	42	9
1.2. 2019	7. den	0	0	0	0	0
8.2. 2019	14. den	0	0	0	0	0
15.2. 2019	21. den	0	0	0	0	0
22.2. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 11: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 4517 v 1 % vzorku SE MONOLAURINU OA88729

<i>Escherichia coli</i> CCM 4517, 1 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
15. 4. 2019	1. den	64	25	7	1	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29. 4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 12: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 4517 v 10 % vzorku SE MONOLAURINU OA88729

<i>Escherichia coli</i> CCM 4517, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
15. 4. 2019	1. den	26	12	3	0	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29. 4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 13: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 3954 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729

Escherichia coli CCM 3954, 1 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	89	32	16	3	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29. 4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 14: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 3954 v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729

Escherichia coli CCM 3954, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	36	19	11	2	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29. 4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 15: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 2024 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729

Escherichia coli CCM 2024, 1 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	118	30	10	1	0
23. 4. 2019	7. den	36	14	2	2	0
29. 4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 16: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 2024 v 10 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88729

Escherichia coli CCM 2024, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLLAURIN OA88729, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	45	17	5	1	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29. 4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 17: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 4517 v 1 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730

Escherichia coli CCM 4517, 1 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAUURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	53	20	3	0	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29.4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 18: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 4517 v 10 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730

Escherichia coli CCM 4517, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAUURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	15	6	0	0	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29.4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 19: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 3954 v 1 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730

Escherichia coli CCM 3954, 1 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAUURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	75	24	12	2	
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29.4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 20: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 3954 v 10 % vzorku SE MONOLAUURINU OA88730

Escherichia coli CCM 3954, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLAUURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	28	10	4	1	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29.4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 21: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 2024 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730

Escherichia coli CCM 2024, 1 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLLAURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	100	24	7	1	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29.4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 22: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 2024 v 1 % vzorku SE MONOLLAURINU OA88730

Escherichia coli CCM 2024, 10 %						
Datum, název vzorku: SE MONOLLAURIN OA88730, šarže: 271218-MS 50g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
15. 4. 2019	1. den	35	11	2	0	0
23. 4. 2019	7. den	0	0	0	0	0
29.4. 2019	14. den	0	0	0	0	0
6. 5. 2019	21. den	0	0	0	0	0
13. 5. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 23: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 5172 v 0,1 % vzorku MONOLLAURIN SE OA92502

Escherichia coli CCM 5172, 0,1 %						
Datum, název vzorku: MONOLLAURIN SE OA92502, šarže: 100419-MS 30g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
17.9. 2019	1. den	252	32	4	1	0
24.9. 2019	7. den	0	0	0	0	0
1.10. 2019	14. den	0	0	0	0	0
8.10. 2019	21. den	0	0	0	0	0
15.10. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 24: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 5172 v 1 % vzorku MONOLLAURIN SE OA92502

Escherichia coli CCM 5172, 1 %						
Datum, název vzorku: MONOLLAURIN SE OA92502, šarže: 100419-MS 30g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
17.9. 2019	1. den	170	18	1	0	0
24.9. 2019	7. den	0	0	0	0	0
1.10. 2019	14. den	0	0	0	0	0
8.10. 2019	21. den	0	0	0	0	0
15.10. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 25: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 5172 v 10 % vzorku MONOLAURIN SE OA92502

Escherichia coli CCM 5172, 10 %						
Datum, název vzorku: MONOLAURIN SE OA92502, šarže: 100419-MS 30g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
17.9. 2019	1. den	21	1	0	0	0
24.9. 2019	7. den	0	0	0	0	0
1.10. 2019	14. den	0	0	0	0	0
8.10. 2019	21. den	0	0	0	0	0
15.10. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 26: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 8874 v 0,1 % vzorku MONOLAURIN SE OA92502

Escherichia coli CCM 8874, 0,1 %						
Datum, název vzorku: MONOLAURIN SE OA92502, šarže: 100419-MS 30g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
17.9. 2019	1. den	> 300	275	52	4	1
24.9. 2019	7. den	89	13	0	0	0
1.10. 2019	14. den	0	0	0	0	0
8.10. 2019	21. den	0	0	0	0	0
15.10. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 27: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 8874 v 1 % vzorku MONOLAURIN SE OA92502

Escherichia coli CCM 8874, 1 %						
Datum, název vzorku: MONOLAURIN SE OA92502, šarže: 100419-MS 30g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
17.9. 2019	1. den	> 300	189	39	9	1
24.9. 2019	7. den	0	0	0	0	0
1.10. 2019	14. den	0	0	0	0	0
8.10. 2019	21. den	0	0	0	0	0
15.10. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 28: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 8874 v 10 % vzorku MONOLAURIN SE OA92502

Escherichia coli CCM 8874, 10 %						
Datum, název vzorku: MONOLAURIN SE OA92502, šarže: 100419-MS 30g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
17.9. 2019	1. den	68	8	2	0	0
24.9. 2019	7. den	0	0	0	0	0
1.10. 2019	14. den	0	0	0	0	0
8.10. 2019	21. den	0	0	0	0	0
15.10. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 29: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 4517 v 0,01 % vzorku β-AESCIN OA92503

Escherichia coli CCM 4517, 0,01 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	Nepočítatelný	> 300	80	18	10
11.6. 2019	7. den	168	32	4	1	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 30: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 4517 v 0,1 % vzorku β-AESCIN OA92503

Escherichia coli CCM 4517, 0,1 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	Nepočítatelný	194	40	6	1
11.6. 2019	7. den	15	2	0	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 31: Průměrný počet kolonií *E. coli* CCM 4517 v 1 % vzorku β-AESCIN OA92503

Escherichia coli CCM 4517, 1 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	Nepočítatelný	80	15	3	1
11.6. 2019	7. den	7	2	0	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 32: Průměrný počet kolonií *P. aeruginosa* CCM 3955 v 0,01 % vzorku β-AESCIN OA92503

Pseudomonas aeruginosa CCM 3955, 0,01 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	Nepočítatelný	> 300	95	26	6
11.6. 2019	7. den	116	28	3	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 33: Průměrný počet kolonií *P. aeruginosa* CCM 3955 v 0,1 % vzorku β-AESCIN OA92503

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955, 0,1 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	> 300	89	30	7	1
11.6. 2019	7. den	0	0	0	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 34: Průměrný počet kolonií *P. aeruginosa* CCM 3955 v 1 % vzorku β-AESCIN OA92503

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955, 1 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	206	66	9	1	0
11.6. 2019	7. den	0	0	0	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 35: Průměrný počet kolonií *S. aureus* CCM 2022 v 0,01 % vzorku β-AESCIN OA92503

<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022, 0,01 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	Nepočitatelný	> 300	156	30	4
11.6. 2019	7. den	0	0	0	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 36: Průměrný počet kolonií *S. aureus* CCM 2022 v 0,1 % vzorku β-AESCIN OA92503

<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022, 0,1 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	95	24	3	1	0
11.6. 2019	7. den	0	0	0	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 37: Průměrný počet kolonií *S. aureus* CCM 2022 v 1 % vzorku β-AESCIN OA92503

<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 2022, 1 %						
Datum, název vzorku: β-aescin OA92503, šarže: 021017, 15g						
Datum		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
4.6. 2019	1. den	0	0	0	0	0
11.6. 2019	7. den	0	0	0	0	0
18.6. 2019	14. den	0	0	0	0	0
25.6. 2019	21. den	0	0	0	0	0
2.7. 2019	28. den	0	0	0	0	0

Příloha 38: Výsledky z testování *Enterococcus hirae* CCM 2423 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS

***Enterococcus hirae* CCM 2423**

Dezinfekční antimykotický sprej, šarže: 150819-MS

11.12. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmičkého snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		612	Průměr	0,05násobek CFU		
		643	627,5	31,375		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				89	Průměr	
				87	88	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				91	Průměr	
				88	89,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				25	Průměr	
				24	24,5	

Příloha 39: Výsledky z testování *Escherichia coli* CCM 4517 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS

***Escherichia coli* CCM 4517**

Dezinfekční antimykotický sprej, šarže: 150819-MS

11.12. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmičkého snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		528	Průměr	0,05násobek CFU		
		514	521	26,05		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				69	Průměr	
				68	68,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				71	Průměr	
				65	68	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				18	Průměr	
				20	19	

Příloha 40: Výsledky z testování *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS

***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961**

Dezinfekční antimykotický sprej, šarže: 150819-MS

11.12. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmičkého snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		398	Průměr	0,05násobek CFU		
		361	379,5	18,975		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				54	Průměr	
				51	52,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				49	Průměr	
				51	50	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				13	Průměr	
				17	15	

Příloha 41: Výsledky z testování *Staphylococcus aureus* CCM 4516 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS

***Staphylococcus aureus* CCM 4516**

Dezinfekční antimykotický sprej, šarže: 150819-MS

11.12. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		487	Průměr	0,05násobek CFU		
		501	494	24,7		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				68	Průměr	
				65	66,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				63	Průměr	
				64	63,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				19	Průměr	
				12	15,5	

Příloha 42: Výsledky z testování *Candida albicans* CCM 8215 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS

***Candida albicans* CCM 8215**

Dezinfekční antimykotický sprej, šarže: 150819-MS

11.12. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		489	Průměr	0,05násobek CFU		
		465	477	23,85		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				58	Průměr	
				61	59,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				59	Průměr	
				63	61	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				15	Průměr	
				17	16	

Příloha 43: Výsledky z testování *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 na Dezinfekční sprej, šarže 150819-MS

***Aspergillus brasiliensis* CCM 8222**

Dezinfekční antimykotický sprej, šarže: 150819-MS

11.12. 2019	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicidní suspenze 9,5·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		189	Průměr	0,05násobek CFU		
		201	195	9,75		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				18	Průměr	
				19	18,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				17	Průměr	
				15	16	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				5	Průměr	
				6	5,5	

Příloha 44: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Enterococcus hirae* CCM 2423

***Enterococcus hirae* CCM 2423**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 50% roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		594	Průměr	0,05násobek CFU		
		611	602,5	30,125		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				78	Průměr	
				71	74,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				59	Průměr	
				68	63,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				15	Průměr	
				18	16,5	

Příloha 45: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Escherichia coli* CCM 4517

***Escherichia coli* CCM 4517**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 50% roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		586	Průměr	0,05násobek CFU		
		591	588,5	29,425		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				81	Průměr	
				76	78,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				68	Průměr	
				72	70	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				8	Průměr	
				11	9,5	

Příloha 46: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961

***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 50% roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		411	Průměr	0,05násobek CFU		
		428	419,5	20,975		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				59	Průměr	
				51	55	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				49	Průměr	
				48	48,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				12	Průměr	
				13	12,5	

Příloha 47: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Staphylococcus aureus* CCM 4516

***Staphylococcus aureus* CCM 4516**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 50 % roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmičkého snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		598	Průměr	0,05násobek CFU		
		612	605	30,25		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				88	Průměr	
				91	89,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				79	Průměr	
				81	80	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				18	Průměr	
				15	16,5	

Příloha 48: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Candida albicans* CCM 8215

***Candida albicans* CCM 8215**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 50% roztok

13.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmičkého snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		483	Průměr	0,05násobek CFU		
		461	472	23,6		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				78	Průměr	
				91	84,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				68	Průměr	
				65	66,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				8	Průměr	
				11	9,5	

Příloha 49: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222

***Aspergillus brasiliensis* CCM 8222**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 50% roztok

10.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicidní suspenze 9,5·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		188	Průměr	0,05násobek CFU		
		218	203	10,15		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				41	Průměr	
				38	39,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				45	Průměr	
				41	43	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				14	Průměr	
				9	11,5	

Příloha 50: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Enterococcus hirae* CCM 2423

***Enterococcus hirae* CCM 2423**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 30% roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		594	Průměr	0,05násobek CFU		
		611	602,5	30,125		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				78	Průměr	
				71	74,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				59	Průměr	
				68	63,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				19	Průměr	
				21	20	

Příloha 51: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Escherichia coli* CCM 4517

***Escherichia coli* CCM 4517**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 30% roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		586	Průměr	0,05násobek CFU		
		591	588,5	29,425		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				81	Průměr	
				76	78,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				68	Průměr	
				72	70	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				15	Průměr	
				17	16	

Příloha 52: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961

***Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 30% roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		411	Průměr	0,05násobek CFU		
		428	419,5	20,975		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				59	Průměr	
				51	55	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				49	Průměr	
				48	48,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				17	Průměr	
				16	16,5	

Příloha 53: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Staphylococcus aureus* CCM 4516

***Staphylococcus aureus* CCM 4516**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 30% roztok

14.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita bakteriální suspenze 1,5·10 ⁹ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 5 log pro baktericidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		598	Průměr	0,05násobek CFU		
		612	605	30,25		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				88	Průměr	
				91	89,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				79	Průměr	
				81	80	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				22	Průměr	
				17	19,5	

Příloha 54: Výsledky z testování 30% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Candida albicans* CCM 8215

***Candida albicans* CCM 8215**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 30% roztok

13.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita levurocidní suspenze 6·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro levurocidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		483	Průměr	0,05násobek CFU		
		461	472	23,6		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				78	Průměr	
				91	84,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				68	Průměr	
				65	66,5	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				15	Průměr	
				12	13,5	

Příloha 55: Výsledky z testování 50% koncentrace Antimikrobiálního spreje, šarže 031219-MS na *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222

***Aspergillus brasiliensis* CCM 8222**

Antimikrobiální sprej, šarže: 031219-MS, 250 ml, 30% roztok

10.01.2020	ředění	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Počáteční denzita fungicidní suspenze 9,5·10 ⁸ CFU/ml	Počet CFU/ml	15	0	0	0	0
		11	0	0	0	0
Kritérium přijatelnosti: požadovaná minimální hodnota logaritmického snížení ≥ 4 log pro fungicidní účinek		splněno	splněno	splněno	splněno	splněno
<i>Validační substance</i>		188	Průměr	0,05násobek CFU		
		218	203	10,15		
<i>Kontrola experimentálních podmínek</i>				41	Průměr	
				38	39,5	
<i>Kontrola neutralizačního činidla</i>				45	Průměr	
				41	43	
<i>Kontrola metody neutralizačního ředění</i>				18	Průměr	
				15	16,5	