

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Vesna KUHAR

**DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJ *E. coli* O157:H7 IN
Lactobacillus gasseri K7 V BLATU IN ORGANIH MIŠI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**DETECTION OF BACTERIA *E. coli* O157:H7 AND
Lactobacillus gasseri K7 IN THE FAECES AND ORGANS OF MICE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič, za somentorico dr. Bojanu Bogovič Matijašić in za recenzentko doc. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Somentorica: dr. Bojana Bogovič Matijašić

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vesna KUHAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24/.26:599.322/.324:612.33(043)=163.6
KG	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7/ <i>E. coli</i> O157:H7/probiotične bakterije/miši/gastrointestinalni trakt/RAPD/PCR
AV	KUHAR, Vesna
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (somentorica)/JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2009
IN	DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJ <i>E. coli</i> O157:H7 IN <i>Lactobacillus gasseri</i> K7 V BLATU IN ORGANIH MIŠI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 64 str., 15 pregl., 24 sl., 4 pril., 74 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Preiskali smo vzorce blata, vsebine črevesja in organov, predhodno pridobljenih v <i>in vivo</i> raziskavi na 50 miših. Tri skupine miši so dva tedna oralno prejemale probiotični humani izolat <i>Lb. gasseri</i> K7 (Rif ^r) ($1,2 \times 10^9$ KE), pri čemer je po ena skupina živali prejela tudi po en odmerek enterohemoragične <i>E. coli</i> O157:H7 (10^9 KE), bodisi ob začetku aplikacije probiotika ali s tedenskim zamikom. Ena skupina je bila kontrolna, zadnja pa je prejela enkratni odmerek <i>E. coli</i> O157:H7. Na selektivnih gojiščih MRS z rifampicinom (K7 (Rif ^r)) in Fluorocult (O157:H7) smo ugotavljali število KE/g oziroma prisotnost obeh testnih sevov, njuno identiteto pa smo potrjevali še z molekularnimi metodami (RAPD in multiplex PCR). Število KE smo ugotavljali tudi na gojiščih za koliformne bakterije in za laktobacile. Ugotovili smo, da uživanje probiotičnega seva ni imelo statistično značilnega vpliva na število bakterij na gojiščih za koliformne bakterije in za laktobacile ($p > 0,05$). Oba seva, K7 (Rif ^r) in O157:H7, sta preživelna prehod skozi prebavila, saj smo jih uspešno zasledili v blatu. Prisotnosti nobenega od testnih sevov 7 dni po prenehanju aplikacije probiotikov v blatu nismo ugotovili. V organih njune prisotnosti nismo ugotovili. Bakterije K7 (Rif ^r) smo dokazali tudi v vsebini slepega črevesa pri eni živali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24/.26:599.322/.324:612.33(043)=163.6
CX *Lactobacillus gasseri* K7/*E. coli* O157:H7/probiotic bacteria/mice/gastrointestinal tract/RAPD/PCR
AU KUHAR, Vesna
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)/BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co-advisor)/JAMNIK, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Dep. of Food Sci. and Techn.
PY 2009
TI DETECTION OF BACTERIA *E. coli* O157:H7 AND *Lactobacillus gasseri* K7 IN THE FAECES AND ORGANS OF MICE
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 64 p., 15 tab., 24 fig., 4 ann., 74 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Samples of faeces, intestinal content and organs obtained previously in *in vivo* study on 50 mice were examined. Three groups of mice received for two months once daily probiotic human isolate *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) ($1,2 \times 10^9$ CFU), while two of the groups received also one dose of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 (10^9 CFU) either at the beginning of probiotic application or one week later. One group was a control one, and the last group received one dose of *E. coli* O157:H7 only. The number (CFU/g) or the presence of both test strains were determined on selective media MRS with rifampicin (K7 (Rif^r)) and Fluorocult (O157:H7), while the identity of the isolates was additionally confirmed by molecular methods (RAPD and multiplex PCR). The number of CFU was determined also on the media for coliform bacteria and lactobacilli. It was found that the administration of probiotic strain did not significantly influence the viable counts obtained on the media for coliforms and lactobacilli ($p > 0,05$). Both, K7 (Rif^r) and O157:H7 strains survived the passage through the intestines as they were successfully detected in the faeces. The presence of *E. coli* O157:H7 or *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) in the faeces was not confirmed 7 days after ceasing application of both strains. In organs there were no O157:H7 or K7 (Rif^r) cells detected. In one animal, the K7 (Rif^r) cells were found in the content of caecum .

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII

1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 ROD <i>Lactobacillus</i>	3
2.1.1 <i>Lactobacillus gasseri</i> K7.....	6
2.2 NORMALNA MIKROBNA FLORA PREBAVIL	7
2.3 VRSTA <i>Escherichia coli</i>	8
2.3.1 Enterohemoragični sev O157:H7.....	10
2.4 PATOGENOST IN VIRULENCA	12
2.5 PROBIOTIKI	13
2.6 KLASIČNE MIKROBIOLOŠKE IN MOLEKULARNE METODE KARAKTERIZACIJE PROBIOTIKOV	15
2.6.1 RAPD PCR za detekcijo <i>Lb. gasseri</i> K7 (Rif^r)	16
2.7 METODE IDENTIFIKACIJE <i>Escherichia coli</i>	17
2.7.1 Multiplex PCR za detekcijo <i>E. coli</i> O157:H7	17

3 MATERIALI IN METODE.....	18
3.1 NAČRT POSKUSA	18
3.2 MATERIALI.....	21
3.2.1 Laboratorijske miši in krma	21
3.2.2 Bakterijski sevi	21
3.2.3 Vzoreci	21
3.2.4 Gojišča in raztopine	22
3.2.4.1 Trdno gojišče za koliformne bakterije (Chromocult® Coliform Agar).....	22
3.2.4.2 Trdno gojišče za <i>E. coli</i> O157:H7 (Fluorocult® <i>E.coli</i> O157:H7 Agar)	22
3.2.4.3 Gojišče za laktobacile (MRS)	22
3.2.4.4 Gojišče za <i>Lb. gasseri</i> K7 (Rif ^r) (MRS+rif).....	22
3.2.4.5 Tekoče gojišče MRS	22
3.2.4.6 Fiziološka raztopina	23
3.2.4.7 Pufer TAE (TRIS acetatni pufer)	23
3.2.5 Kemikalije.....	23
3.2.5.1 PCR	23
3.2.5.2 Elektroforeza in barvanje	24
3.2.5.3 Osamitev DNA.....	24
3.3 METODE	25
3.3.1 Živali in krmljenje	25
3.3.2 Vzorčenje	26
3.3.2.1 Homogenizacija blata, organov in črevesne vsebine	27
3.3.3 Klasična mikrobiološka tehnika gojenja.....	28
3.3.4 Statistična obdelava podatkov	29
3.3.5 Identifikacija bakterij.....	29
3.3.5.1 Osamitev DNA za ugotavljanje prisotnosti <i>E. coli</i> O157:H7	29
3.3.5.2 Osamitev DNA za ugotavljanje prisotnosti <i>Lb. gasseri</i> K7 (Rif ^r)	30
3.3.5.3 Multiplex PCR	31
3.3.5.4 RAPD	32
3.3.5.5 Agarozna gelska elektroforeza	33

4 REZULTATI	34
4.1 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V VZORCIH BLATA, ORGANIH IN ČREVESNE VSEBINE TER POTRDITEV SEVOV PRISOTNIH BAKTERIJ	34
4.1.1 Izgled kolonij in sestavine gojišč.....	35
4.1.2 Število preiskovanih bakterij v blatu	36
4.1.2.1 Rast bakterij na gojišču MRS.....	36
4.1.2.2 Rast bakterij na gojišču MRS+rif.....	37
4.1.2.3 Rast bakterij na gojišču Chromocult.....	38
4.1.2.4 Rast bakterij na gojišču Fluorocult	39
4.1.3 Prisotnost preiskovanih bakterij v organih	39
4.1.4 Rezultati statistične obdelave podatkov – število preiskovanih bakterij v blatu	40
4.1.5 Potrditev sevov z metodo PCR.....	42
4.1.5.1 Reakcija multiplex PCR.....	43
4.1.5.2 Analiza RAPD.....	45
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	48
5.1 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV O ŠTEVILU BAKTERIJ V BLATU	48
5.2 ŠTEVILO BAKTERIJ V BLATU	49
5.2.1 Gojišče MRS z rifampicinom	49
5.2.2 Gojišči MRS in Chromocult.....	49
5.2.3 Gojišče Fluorocult.....	50
5.3 POTRJEVANJE TESTNIH SEVOV S PCR.....	50
5.3.1 Potrditev <i>E. coli</i> O157:H7	51
5.3.2 Potrditev <i>Lb. gasseri</i> K7 (Rif^r)	52
5.4 SKLEPI	55
6 POVZETEK	56
7 VIRI.....	58

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Pregled homo- in heterofermentativnih vrst laktobacilov (Sharpe, 1979)	3
Preglednica 2:	Delovanje laktobacilov znotraj intestinalnega trakta gostitelja (Demeria in sod., 2009)	4
Preglednica 3:	Normalna mikrobiota gastrointestinalnega trakta (Uzunović Kamberović, 2009)	7
Preglednica 4:	Bakterijski sevi, uporabljeni v poskusu	21
Preglednica 5:	Nastanitev miši v pet skupin in označitev kletk	25
Preglednica 6:	Sestava 20 µL reakcijske mešanice za analizo multiplex PCR	31
Preglednica 7:	Protokol analize multiplex PCR	32
Preglednica 8:	Sestava 20 µL reakcijske mešanice za analizo RAPD	33
Preglednica 9:	Protokol analize RAPD	33
Preglednica 10:	Opis gojišč za laktobacile, koliformne bakterije in <i>E. coli</i> O157:H7 (Merck, 2006).....	35
Preglednica 11:	Osnovni statistični parametri števila preiskovanih bakterij v blatu, glede na čas vzorčenja	40
Preglednica 12:	Osnovni statistični parametri števila preiskovanih bakterij v blatu, glede na vpliv skupine	41
Preglednica 13:	Število analiziranih vzorcev blata, organov in črevesne vsebine z metodo PCR.....	42
Preglednica 14:	Rezultati reakcije multiplex PCR – število pozitivnih rezultatov od števila vseh analiziranih izpirkov <i>E. coli</i> iz kolonij, pridobljenih na gojišču Fluorocult iz blata (2. teden poskusnega obdobja) ter iz organov in črevesne vsebine (ob žrtvovanju).....	43
Preglednica 15:	Rezultati analize RAPD – število izolatov, za katere smo potrdili identičnost s sevom K7 (Rif ^r) ter število vseh analiziranih izolatov iz blata, organov in črevesne vsebine miši v 2. in 3. tednu poskusnega obdobja ter ob žrtvovanju	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba celične stene laktobacilov (Demeria in sod., 2009).....	4
Slika 2: Interakcija <i>Lactobacillus helveticus</i> R389 s črevesnim epitelijem miši BALB/c (Galdeano in sod., 2007)	5
Slika 3: Po Gramu negativne paličaste bakterije <i>Escherichia coli</i> (Uzunović Kamberović, 2009).....	8
Slika 4: Delovanje šestih serotipov <i>E. coli</i> , ki povzročajo driske: ETEC, EHEC, EAEC, DAEC, EPEC in EIEC (Nataro in Kaper, 1998)	9
Slika 5: <i>E. coli</i> O157:H7 s številnimi flagelami, posneta s transmisijskim elektronskim mikroskopom (Uzunović Kamberović, 2009).....	11
Slika 6: Splošna shema patogenskih mehanizmov, ki privedejo do škodljivih posledic okužb (Koren in sod., 2002)	12
Slika 7: Tarčno delovanje probiotikov na patogene bakterije ali njihove toksine (Sleator in Hill, 2008)	14
Slika 8: Prikaz poskusa	19
Slika 9: Potek dela od priprave vzorcev do analize pomnožkov PCR	20
Slika 10: Testne miši C57BL/6J.....	21
Slika 11: Nastanitev miši v pet skupin (A, B, C, D, E) po 10 živali	25
Slika 12: Aplikacija testnih sevov mišim direktno v usta, s pomočjo sonde	26
Slika 13: Vzorčenje blata	27
Slika 14: Štetje bakterijskih kolonij na petrijevih ploščah	34
Slika 15: <i>Lactobacillus casei</i> (Merck, 2006).....	35
Slika 16: <i>E. coli</i> O157:H7, <i>E. coli</i> , <i>Serratia marcescens</i> (Merck, 2006)	35
Slika 17: <i>E. coli</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> (Merck, 2006).....	35
Slika 18: Število bakterij skupin A, B, C, D, E v blatu miši, zraslih na gojišču za laktobacile, 1., 2., 3. in 4. teden poskusnega obdobja	36

Slika 19: Število bakterij seva K7 (Rif ^r) in nekaterih drugih proti rifampicinu odpornih laktobacilov skupin A, B, C, D, E v blatu miši, zraslih na gojišču MRS+rif, 1., 2., 3. in 4. teden poskusnega obdobja	37
Slika 20: Število koliformnih bakterij skupin A, B, C, D, E, izoliranih iz blata mišk, zraslih na gojišču Chromocult, 1., 2., 3. in 4. teden poskusnega obdobja.....	38
Slika 21: Pomnožki multiplex PCR, s katerim smo dokazali sev <i>E.coli</i> O157:H7	44
Slika 22: Pomnožki RAPD z z. o. M-13	46
Slika 23: Pomnožki RAPD z z. o. M-13, ki dokazujejo prisotnost K7 (Rif ^r) v blatu	47
Slika 24: Pomnožki RAPD z z. o. M-13, s katerim smo dokazali sev K7 (Rif ^r) v črevesni vsebini.....	47

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Teža organov miši v g
- Priloga B: Prisotnost/odsotnost *E. coli* v izpirkih s plošč ($R = 10^{-3}$) Fluorocult na celotno maso organa
- Priloga C: Prisotnost/odsotnost laktobacilov na gojišču MRS+rif na celotno maso organa
- Priloga D1: Povprečja rezultatov štetja kolonijskih enot na posameznih gojiščih, izražena kot log KE/g blata
- Priloga D2: Standardni odkloni štetja kolonijskih enot na posameznih gojiščih, izraženi kot log KE/g blata

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava ali simbol: Pomen:

bp	bazni par
rif	rifampicin
Da	dalton, enota za molekulsko maso proteinov
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	mešanica nukleotidov
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (etylendiaminetetraocetna kislina)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	enterohemoragična <i>Escherichia coli</i>
G + C	gvanin in citozin v DNA
O157:H7	<i>Escherichia coli</i> serotip O157:H7
GIT	gastrointestinalni trakt
GRAS	generally regarded as safe (splošno priznane kot varne – MKB)
LAB	lactic acid bacteria (mlečnokislinske bakterije – MKB)
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lb. gasseri</i> K7 (Rif ^r)	Derivat seva K7, rezistenten proti antibiotiku rifampicinu v koncentraciji 120 µg/mL
KE	kolonijske enote
K7	<i>Lactobacillus gasseri</i> K7
M	molarnost (mol/L)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče za laktobacile po De Man, Rogosa, Sharpe
z. o.	začetni oligonukleotid
PCR	polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
RAPD	randomly amplified polymorphic DNA (pomnoževanje DNA z naključnimi oligonukleotidi)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomalna ribonukleinska kislina)
rpm	revolutions per minute (obrati na minuto)
TAE	TRIS acetatni pufer
U	unit (enota, encimska enota)
UV	ultravijoličen (-a svetloba)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Nevirulentni sevi vrste *Escherichia coli* so del normalne črevesne flore prebavil, kjer s svojo prisotnostjo ovirajo rast patogenih bakterij, virulentni sevi pa povzročajo različne infekcijske bolezni. Med najbolj patogene spada enterohemoragična *E. coli* (EHEC), serotip O157:H7, ki je bila leta 1982 prvič opisana kot povzročiteljica krvave driske pri človeku.

E. coli po literaturi povzroča črevesne okužbe pri človeku v 0,5 do 1,7 % primerov. EHEC povzroča hemoragični kolitis z resnimi zapleti, zlasti pri otrocih in starejših ljudeh, kar kaže na velik pomen imunskega odgovora gostitelja. EHEC ni invazivna, temveč deluje preko enega ali dveh citotoksinov, ki se v velikih količinah izločata v debelem črevesu, poškodujeta njegove endotelne žilne celice, lahko pa prizadaneta tudi druge organe. Ker je toksin EHEC zelo podoben toksinu, ki ga izloča *Shigella dysenteriae*, se imenuje shigapodobni toksin (Blatnik, 2002).

Mikroorganizmi, ki naseljujejo črevesno sluznico, predstavljajo učinkovito oviro za patogene bakterije, saj zasedajo mesta pripenjanja in s tem preprečujejo njihovo vezavo na sluz ali na črevesne epitelne celice, proizvajajo protimikrobne snovi in tekmujejo s patogenimi bakterijami za hranila. Poleg tega obstaja vse več dokazov, da uravnavajo homeostazo gostiteljevih obrambnih mehanizmov (Galdeano in sod., 2007).

Sev *Lactobacillus gasseri* K7 je humani izolat, ki s proizvodnjo bakteriocinov in drugih metabolitov *in vitro* zavira rast širokega spektra bakterijskih vrst. Dosedanje raziskave so pokazale, da *Lb. gasseri* K7 preživi prehod skozi prebavila ter vsaj začasno kolonizira črevesno sluznico prašičkov (Bogovič Matijašić in sod., 2006 b). Na *in vitro* modelu Caco-2 so ugotovili, da je sev K7 sposoben zmanjšati vezavo patogene bakterije *Escherichia coli* na enterocite (Bogovič Matijašić in sod., 2006 a).

Probiotične lastnosti seva *Lactobacillus gasseri* K7 so raziskali že s številnimi testi *in vitro*, ki pa ne odsevajo dejanskega fiziološkega dogajanja v živem organizmu. Tako v testih *in vitro* na Caco-2 celični liniji ni prisotna črevesna sluz, ki je zelo pomemben faktor pri interakciji bakterij s črevesjem gostitelja. V *in vitro* testih s človeško in živalsko sluzjo pa je zanemarjen vpliv receptorjev enterocitov. Zato so za kritično ovrednotenje vpliva izbranega laktobacila na gastrointestinalni trakt gostitelja in okužbo z *E. coli* potrebni tudi testi *in vivo* (Bogovič Matijašić in sod., 2003).

1.2 NAMEN NALOGE

Diplomsko delo je del širše raziskave, katere namen je bil s poskusi *in vivo* na modelu miši potrditi, da so bakterije seva *Lactobacillus gasseri* K7 (*Rif^r*) sposobne zmanjšati vezavo *Escherichia coli* O157:H7 in morebitno translokacijo *E. coli* v parenhimske organe ter s tem zmanjšati resnost okužbe.

V okviru diplomskega dela smo se usmerili na mikrobiološke analize blata in organov ter molekularne analize izraslih kolonij obeh testnih sevov.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*) in *E. coli* O157:H7 bo mogoče selektivno zaslediti v blatu in organih miši s pomočjo gojenja na selektivnih gojiščih in potrjevanja z molekularnimi tehnikami.
- Pri miših, ki so oralno prejemale *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*) in *E. coli* O157:H7, oziroma enega od sevov, bomo v blatu in v posameznih organih zasledili žive celice zaužitih bakterij.
- Seva *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*) in *E. coli* O157:H7 se pripenjata na črevesno sluznico miši.
- Pri miših, ki so poleg seva in *E. coli* O157:H7 prejemale tudi *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*), bo število pripetih celic seva *E. coli* O157:H7 na črevesni sluznici manjše.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD *Lactobacillus*

Laktobacili so eden najpomembnejših rodov mlečnokislinskih bakterij, ki zajema več kot 165 vrst. Rod *Lactobacillus* je zelo heterogen, saj vsebuje vrste z zelo raznolikimi biokemijskimi in fiziološkimi lastnostmi. Heterogenost se kaže v različni vsebnosti G+C v DNA, ki znaša od 32 % do 53 %. Klasifikacija laktobacilov temelji na razlikah v nukleotidnem zaporedju gena za 16S rRNA. Glede na končne proizvode presnove pa jih delimo na homo- in heterofermentativne. Posamezne vrste laktobacilov prikazuje spodnja preglednica (Pot in Tsakalidou, 2009).

Preglednica 1: Pregled homo- in heterofermentativnih vrst laktobacilov (Sharpe, 1979)

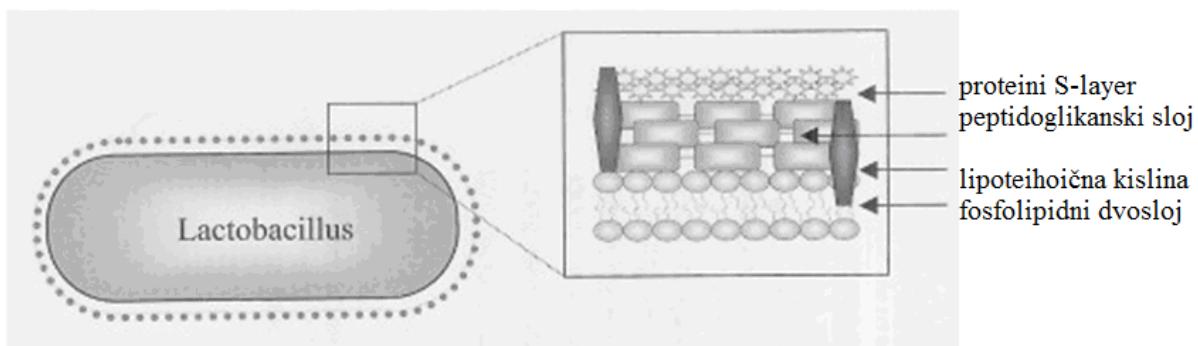
HOMOFERMENTATIVNE VRSTE	HETEROFERMENTATIVNE VRSTE
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	<i>Lb. buchneri</i>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. confusus</i>
<i>Lb. jensenii</i>	<i>Lb. fermentum</i>
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. viridescens</i>
<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fructivorans</i>
<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. curvatus</i>	
<i>Lb. homohiochii</i>	
<i>Lb. plantarum</i>	
<i>Lb. yamanshiensis</i>	

So po Gramu pozitivne, dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene palčke. Ne vsebujejo porfirinov in citokromov in nimajo transportne verige elektronov. Energijo pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev. Poleg sladkorjev, ki jih lahko fermentirajo, potrebujejo tudi mnoge rastne dejavnike, kot so vitamini, organske baze in aminokisline, zato jih uvrščamo med prehransko zahtevne bakterije. V odnosu do kisika so aerotolerantni anaerobi. Razmnožujejo se pri temperaturah od 2 °C do 35 °C, optimum pa je med 30 °C in 40 °C. Rastejo pri vrednostih pH od 3,0 do 7,0, minimalna vrednost a_w za rast je okoli 0,90 (Adamič in sod., 2003).

Laktobacili predstavljajo del običajne gastrointestinalne mikrobiote ljudi in mnogih živali, nahajajo pa se tudi v genitalnem in respiratornem traktu človeka. Ob rojstvu je gastrointestinalni trakt (GIT) steril, kmalu pa ga poselijo številne bakterije. Od prvega meseca dalje se mikrobiota črevesja spreminja in postaja vedno bolj pestra. Katera mikrobna populacija bo prevladovala, pa je odvisno od biokemijske kapacitete mikroorganizma, mikrookolja gostitelja ter od razpoložljivosti hrani. V črevesju človeka se nahaja okrog 17 vrst laktobacilov, in sicer do 10^8 KE/mL v tankem črevesu in do 10^9

KE/mL v debelem črevesu. Od teh prevladujejo *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Lb. crispatus*, *Lb. casei* in *Lb. salivarius* (Keohane in sod., 2009).

Učinek delovanja laktobacilov na gostitelja je odvisen od njegove koncentracije, vrste in lastnosti seva. Imajo edinstveno zgradbo celične stene. Ta se odraža v aminokislinski sestavi, vsebnosti lipoteihoične kisline in prisotnosti ali odsotnosti površinskih plasti površinskih proteinov - S-layer, ki omogočajo laktobacilom vezavo na površino epitelnih celic gostitelja ter imajo pomembno vlogo pri regulaciji gostiteljevega imunskega odziva. Mikrobne interakcije s črevesno sluznico se kažejo v modulaciji sluznične in sistemsko, naučene ter prirojene imunosti gostitelja (Demeria in sod., 2009). Struktura laktobacilov je predstavljena na sliki 1.



Slika 1: Zgradba celične stene laktobacilov (Demeria in sod., 2009)

Ker so laktobacili naravnji prebivalci gastrointestinalnega trakta in s svojim delovanjem izkazujejo mnogo blagodejnih učinkov na zdravje gostitelja, zanimanje po uporabi vrst iz rodu *Lactobacillus* v svetu vedno bolj narašča (Lebeer S. in sod., 2008).

Njihovo delovanje znotraj gostitelja je opisano v preglednici 2.

Preglednica 2: Delovanje laktobacilov znotraj intestinalnega trakta gostitelja (Demeria in sod., 2009)

UČINKI NA MIKROBIOTO	UČINKI NA ČREVESNO SLUZNICO	UČINKI NA IMUNSKI SISTEM
Kompetitivno izključevanje	Uničenje receptorjev za toksine	Povečano izločanje IgA
Izločanje bakteriocinov	Proizvodnja mucinov	Uravnavanje delovanja imunskih celic
Izločanje organskih kislin	Povečana funkcija pregrade	

Predhodne študije so pokazale, da so mnogi predstavniki rodu *Lactobacillus* sposobni *in vivo* naseliti površino črevesnih epitelnih celic v tkivni kulturi. Nekateri predstavniki *Lb. rhamnosus* in *Lb. acidophilus* imajo sposobnost vezave na črevesne epitelne celice gostitelja in zmanjšanja vezave *E. coli* O157:H7 (Sherman in sod., 2005; Johnson in sod., 2008).

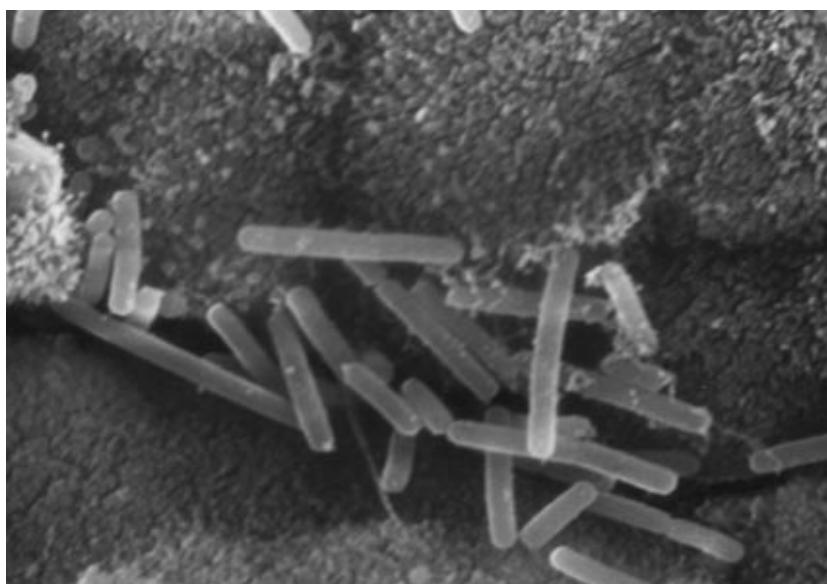
V poskusu *in vivo* na zajčjih mladičih, okuženih z *E. coli* O157:H7, je *Lb. casei* izval imunski odziv proti citotoksinu EHEC in omogočil odstranitev teh bakterij iz intestinalnega trakta (Ogawa in sod., 2001).

Laktobacili so učinkoviti tudi pri preprečevanju kolonizacije O157:H7 v črevesju prezvekovalcev, ki služi kot naravni rezervoar EHEC (Zhao in sod., 1998).

Hickson in sod. (2007) so v humani študiji raziskovali učinek probiotičnega napitka z laktobacili pri driskah, ki se pojavljajo po jemanju antibiotikov. Izkazalo se je, da uživanje napitka dvakrat dnevno med terapijo z antibiotiki in še teden po njej znatno zmanjša pojav driske, do katere pri terapiji z antibiotiki pogosto pride.

V poskusu na miših so ugotovili, da je *Lb. acidophilus* La-5 zmožen omejiti virulenco EHEC *in vitro* in *in vivo* s pomočjo izločanja molekul, ki onesposobijo sistem celične signalizacije patogene bakterije (Medellin in Griffiths, 2009).

Johnson in sod. (2008) so dokazali, da uporaba probiotične mešanice sevov *Lb. rhamnosus* in *Lb. helveticus* *in vivo* pri miših ublaži črevesno okužbo z bakterijo *Citrobacter rodentium* in zavre gastrično okužbo s *Helicobacter pylori* ter izboljša stanje poškodovane epitelne ultrastrukture v debelem črevesju podgan.



Slika 2: Interakcija *Lactobacillus helveticus* R389 s črevesnim epitelijem miši BALB/c (Galdeano in sod., 2007)

2.1.1 *Lactobacillus gasseri* K7

Lactobacillus gasseri K7 je izolat iz blata teeden dni starega dojenčka. Proizvaja bakteriocine, ki protimikrobnno delujejo na določene mlečnokislinske bakterije, predstavnike rodu *Clostridium* (*C. perfringens*, *C. difficile*) ter drugih rodov. Zaradi svojega bakteriocinskega delovanja, je uspešen tudi pri preprečevanju poznega napihovanja sirov. Zato bi sev K7 lahko uporabljali kot zaščitno startersko kulturo za sir in hkrati kot probiotik (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000).

Lb. gasseri K7 je potencialni probiotik, saj *in vitro*, *ex vivo* in *in vivo* izkazuje nekatere probiotične lastnosti, kot so: odpornost proti žolčnim solem in nizkim vrednostim pH ter preživetje v simuliranih intestinalnih pogojih, sposobnost vezave na epitelne celice Caco-2 (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000; Bogovič Matijašič in sod., 2003; Bogovič Matijašič in sod., 2006 a), sposobnost vezave na prašičji intestinalni epitelij *ex vivo* (Bogovič Matijašič in sod., 2006 a) ter naselitev in preživetje v prebavnem traktu miši in odstavljenih prašičkov (Bogovič Matijašič in sod., 2006 b).

Pričadnost seva K7 v vrsto *Lb. gasseri* so potrdili na osnovi njegovih morfoloških lastnosti, biokemijskih reakcij, analize površinskih proteinov (S-layer), reakcije PCR z vrstno specifičnimi začetniki in sekveniranjem 16S rDNA (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000; Čanžek Majhenič in sod., 2003). Human izvor, odpornost proti nizkim vrednostim pH, odpornost proti žolču in proizvodnja protimikrobnih proteinov s široko aktivnostjo so prve opisane lastnosti, na podlagi katerih so sev K7 uvrstili med potencialne probiotike (Bogovič Matijašič in Rogelj, 2000).

Ugotovili so, da ima med laktobacili vrsta *Lb. murinus* najboljšo stopnjo preživelosti pri prehodu skozi GIT odstavljenih prašičkov, saj so med poskusno dobo v blatu ugotovili kar 23,7 % preživelost (Gardiner in sod., 2004). V blatu odstavljenih prašičkov je sev K7 predstavljal 0,2 % celotne populacije laktobacilov, kar je v primerjavi s predhodnimi raziskavami spodbuden rezultat (Rogelj in sod., 2002; Bogovič Matijašič in sod., 2004).

Celice tkivnih kultur, ki se jih najpogosteje uporablja kot model za preučevanje adhezije bakterij na enterocite so Caco-2, HT-29 in HT-20 MTX, ki proizvajajo mukus.

Uspešnost vezave različnih sevov na Caco-2 celično linijo je poleg števila vezavnih mest na enterocitih odvisno tudi od afinitete vezave določenega seva. Pomemben dejavnik pri vrednotenju števila celic, pripetih na Caco-2 celično linijo, je tudi vpliv celične gostote bakterij.

Ugotovili so, da se seva *Lb. LF221* in K7 najučinkoviteje pripenjata na Caco-2 celično linijo v kislem okolju (Bogovič Matijašič in sod., 2003).

2.2 NORMALNA MIKROBNA FLORA PREBAVIL

Predstavniki normalne mikrobne flore so z gostiteljem v komensalnem sožitju. Njihova prisotnost gostitelju ni nujno potrebna, vendar pa s svojo prisotnostjo v določenih predelih gostitelja zelo pomembno prispevajo k ohranjanju zdravja in normalnega delovanja organizma. Kolonizacija črevesja se začne takoj po rojstvu. Novorojenček dobi prvotno mikrobno združbo od svoje matere med rojstvom, kasneje pa ima nanjo velik vpliv predvsem prehrana. Sestava normalne mikrobne flore se med posameznimi anatomske območji razlikuje in s starostjo tudi spreminja. Odvisna je tudi od različnih fizioloških dejavnikov, kot so temperatura telesne površine, vлага, prisotnost hranil in protimikrobnih snovi. Količina mikrobne mase je najmanjša v želodcu (10^3 do 10^5 KE/g vsebine) in dvanajstniku (10^3 do 10^6 KE/g vsebine), največja pa v debelem črevesu (10^8 do 10^{10} KE/g vsebine), zlasti v esastem črevesu in v danki (10^{11} KE/g vsebine), kjer zaseda kar 10 % do 30 % celotne fekalne mase (Seme, 2002).

Z uporabo anaerobnih tehnik gojenja so ugotovili, da je večina mikroorganizmov v črevesju odraslega človeka obligatnih anaerobov, medtem ko je aerobov po nekaterih ocenah tisočkrat manj. Osnovne funkcije črevesne mikroflore so procesi fermentacije, pri čemer se tvorijo kratkoverižne maščobne kisline, povečevanje odpornosti proti kolonizaciji s patogenimi bakterijami ter vzpodbujanje imunskega odziva (Rogelj, 2001).

Reakcija organizma na nespecifične dejavnike, kot je na primer stres, vodi do nepopolnega delovanja mukozne prepreke, kar posledično privede do naseljevanja škodljivih bakterij iz svetline ter sprememb celične morfologije. Mikroorganizmi, ki naseljujejo sluznico, predstavljajo učinkovito oviro za patogene bakterije, saj zasedajo mesta pripenjanja in s tem preprečujejo njihovo vezavo na sluz ali črevesne epitelne celice, proizvajajo protimikrobnne snovi in tekmujejo s patogenimi bakterijami za hranilne snovi. Površina črevesa je sestavljena iz mukoznih epitelnih celic, ključnih pri obrambnem sistemu proti zunanjim dejavnikom. Epitelne celice so polarizirane, povezujejo pa jih tesni stiki, ki vsebujejo integralne membranske proteine, vključno z adhezijskimi molekulami, okludini in kladini. Tovrstne molekule uravnavajo transport ionov in makromolekul ter preprečujejo mikrobne in toksinske interakcije z epitelnim tkivom (Johnson in sod., 2008).

Preglednica 3: Normalna mikrobiota gastrointestinalnega trakta
(Uzunović Kamberović, 2009)

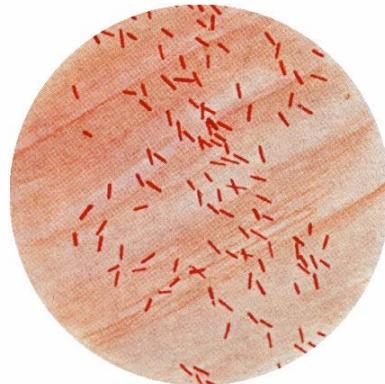
Bakterije GIT		
<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Porphyromonas</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Prevotella</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Cardiobacterium</i>	<i>Mobiluncus</i>	<i>Veillonella</i>

2.3 VRSTA *Escherichia coli*

Bakterije vrste *E. coli* je prvi opisal nemški zdravnik Escherich leta 1885. *Escherichia coli* je bakterija, na kateri so proučili zgradbo in metabolizem bakterijske celice. Uporablja se kot gostiteljski organizem za kloniranje genov in testni organizem pri preizkušanju učinkovitosti protimikrobnih zdravil in razkužil ter kot indikator fekalne kontaminacije (Andlovic, 2002).

So po Gramu negativne, fakultativno anaerobne paličice, ki ob razgradnji glukoze in laktoze tvorijo kislino in plin. Razmnožujejo se pri 10 °C do 46 °C, čeprav številni sevi rastejo tudi pri 4 °C. Minimalna vrednost a_w za rast je od 0,96 do 0,93, najnižja vrednost pH pa 4,3 (Adamič in sod., 2003).

Nevirulentni sevi so del normalne črevesne flore ljudi in živali, virulentni sevi pa povzročajo okužbe prebavil in zunaj črevesne okužbe. Posamezne tipe med seboj ločimo na osnovi O-K-H antigenov. O-antigen je lipopolisaharid na zunanjih celičnih ovojnicih, K-antigeni predstavljajo kapsularne polisaharide, H-antigeni pa so flagelarni proteini.

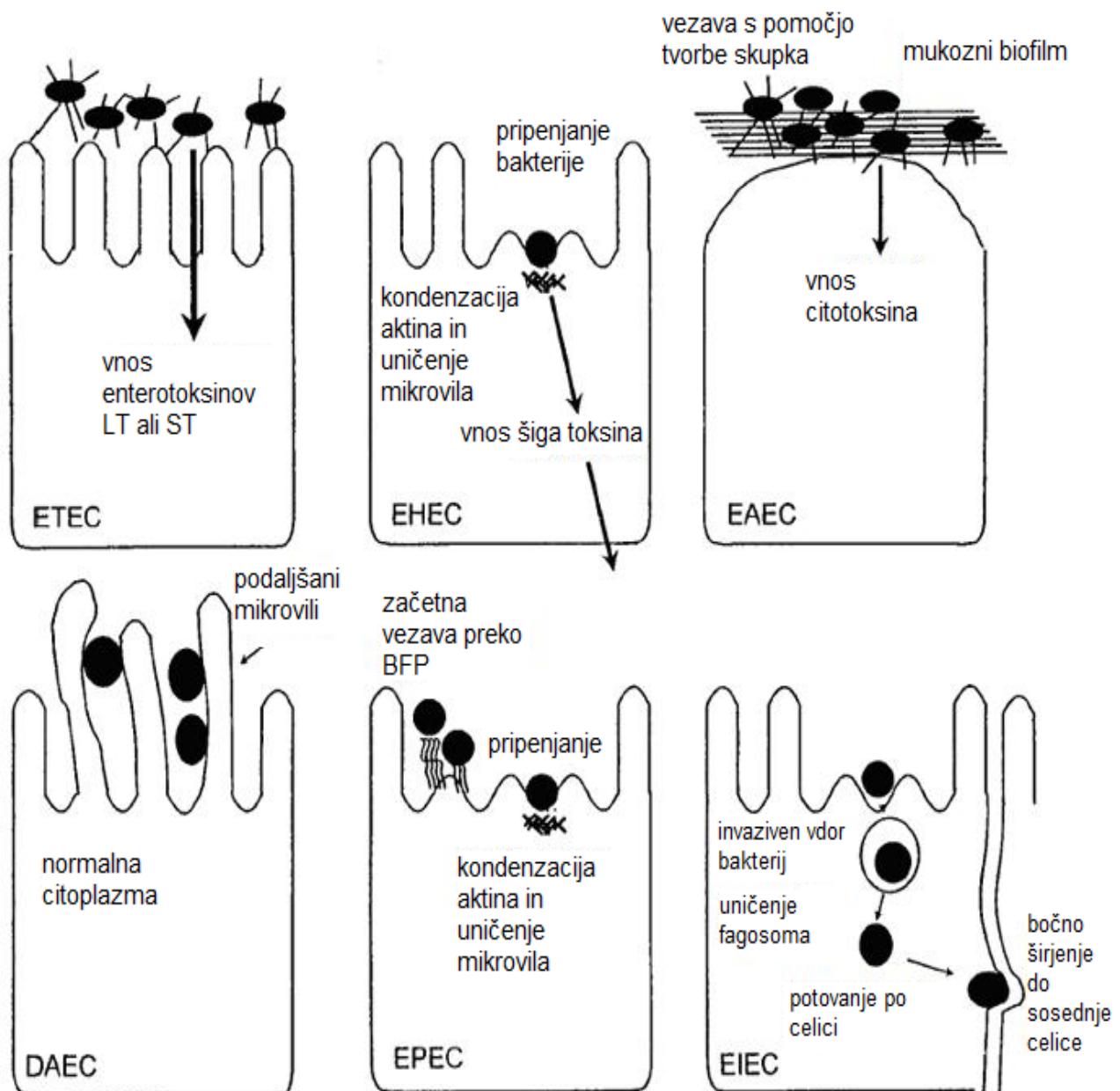


Slika 3: Po Gramu negativne paličaste bakterije *Escherichia coli* (Uzunović Kamberović, 2009)

Na osnovi tipa virulenčnega faktorja in kliničnih znakov gostitelja, lahko seve *E. coli* razdelimo v naslednje kategorije:

- enteropatogena (EPEC) povzroča drisko pri otrocih in živalih,
- enterohemoragična (EHEC), ki je odgovorna za hemoragični kolitis in hemolitični-uremični sindrom (HUS),
- enterotoksigena (ETEC), ki povzroča potovalne driske,
- enteroagregativna (EAEC), katere posledica delovanja so trdovratne driske pri ljudeh,
- difuzno adherentna (DAEC), ki je podskupina EAEC in povzroča drisko pri otrocih,
- enteroinvazivna (EIEC), ki povzroča vodeno drisko in grižo,
- uropatogeno (UPEC), ki povzroča okužbe urinarnega trakta in
- *E. coli*, ki povzroča neonatalni meningitis in sepso (NMEC) (Palaniappan in sod., 2006).

Na sliki 4 so predstavljeni *in vitro* mehanizmi šestih serotipov *E. coli*, ki povzročajo driske. Vsak serotip ima drugačen način delovanja na tarčno evkariantsko celico.



Slika 4: Delovanje šestih serotipov *E. coli*, ki povzročajo driske: ETEC, EHEC, EAEC, DAEC, EPEC in EIEC (Nataro in Kaper, 1998)

2.3.1 Enterohemoragični sev O157:H7

Serotip O157:H7 se v literaturi navaja tudi kot enterohemoragična *E. coli* (EHEC), verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in Shiga-like toxin-producing *E. coli* (SLTEC) (Sherman in sod., 2005).

E. coli O157:H7 proizvaja verotoksina I in II, znana tudi kot shiga-podobna toksina (SLT I in SLT II). Verotoksin je protein, ki *in vitro* uničuje kulture opičjih ledvičnih celic *vero* in povzroči irreverzibilni citopatogeni učinek. Sestavljen je iz podenote A, ki je odgovorna za njegovo toksičnost ter iz petih molekul, ki tvorijo podenoto B, katera omogoča vezavo toksina na specifični tip celic. SLT I je identičen shiga toksinu, ki ga izloča *Shigella dysenteriae*, SLT II pa ima 60 % homologijo. Oba toksina se aktivirata s pomočjo lizogenih bakteriofagov, zato obstaja možnost prenosa na druge črevesne bakterije (Sušić in Tomić Paradžik, 2009).

Mehanizem delovanja verotoksina je osnovan na oviranju sinteze proteinov s pomočjo encima glikozidaze, deluje pa ciljno na debelo črevo gostitelja. Vzrok za bolezen je največkrat zaužitje surove ali nezadostno kuhanje mlete govedine in surovega mleka. Posledice delovanja verotoksina so hemolitični uremični sindrom in hemoragični kolitis, ki povzročita rahlo povišano temperaturo, krče ter najprej vodeno in nato krvavo diarejo (Milohnoja, 2003; Koren, 2002).

O157:H7 na intestinalni epitelni steni gostitelja tvori specifične strukture AE (»attaching, effacing«), ki omogočajo bakteriji stabilno pritrditev in poselitev epitelne površine. Vzava bakterije na celično steno je posledica vbrizganja bakterijskih proteinov v celico gostitelja, s pomočjo posebnih translokacijskih mehanizmov, imenovanih sekrecijski sistem tipa III, kar se odraža v spremembah na citoskeletu in poškodbi mikrovilov. Sistem tipa III je kodiran na lokusu prizadetega enterocita (Nagano in sod., 2003; Medellin in Griffiths, 2009).

Za EHEC in mnoge druge enterobakterije je značilno, da proizvajajo in se odzivajo na specifične kemične signale - feromone. Uporaba tovrstne signalizacije med celicami jim omogoča regulacijo pomembnih elementov, ključnih za njihovo uspešno kolonizacijo in sprožitev okužbe v gostitelju. Na ta način bakterije prilagodijo okolje, da lahko oblikujejo bolj kompetitivno nišo. Specifične gene EHEC za virulenco uravnava signalizacijski sistem AI-3/epinefrin/norepinefrin. AI-3 je molekula, ki jo proizvaja komensalna mikrobiota GIT in je strukturno podobna hormonoma epinefrinu in norepinefrinu, ki ju izloča gostitelj (Medellin in Griffiths, 2009).

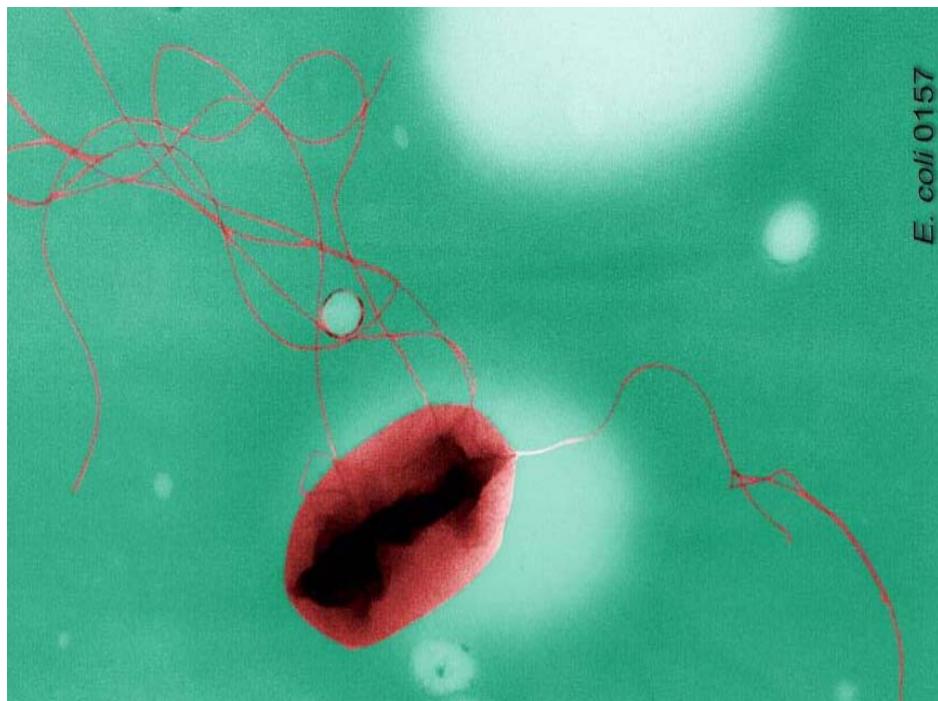
Goldhar in sod. (1986) so v študiji na miših preskušali njihovo primernost za spremljanje vezave enterotoksigene *E. coli* humanega izvora na mišjo črevesno sluznico. Uporabili so dva pristopa. Pri prvem so primerjali kolonizacijsko sposobnost določenega seva ETEC in njene različice, pri drugem pa so uporabili specifičen inhibitor bakterijske adherence na epitelne celice. Ugotovili so, da so miši ustrezni testni model za proučevanje bakterijskih lastnosti ETEC, kot so različne faze intestinalne kolonizacije. Omogoča odkrivanje možnih

inhibitorjev adherence na intestinalne segmente *in vitro* in njihovo zmožnost preprečevanja kolonizacije bakterijskih patogenov.

E. coli O157:H7 je, v primerjavi z ostalimi patogenimi bakterijami, ki povzročajo infekcije z uživanjem kontaminiranih živil, neobičajno odporna na kislo okolje. Če je v mesu prisotna v dovolj visoki koncentraciji, lahko celice preživijo fermentacijo, sušenje in skladiščenje (Uzunović Kamberović in Smole Možina, 2009).

EHEC je najpogostejša povzročiteljica drisk v razvitih državah, saj se simptomi pokažejo že pri zaužitju manj kot 100 celic. Najbolj dovetni za okužbo so otroci, mlajši od deset let, in starejše osebe (Sušić in Tomić Paradžik, 2009).

V razvitih državah je *E. coli* O157:H7 povzročila številne epidemije. Prijavljanje okužbe z EHEC v Sloveniji poteka od leta 1997. V letih od 1997 do 2000 je bilo prijavljenih 836 primerov črevesnih okužb z *E. coli*, od tega 283 z EHEC, kar predstavlja 33,9 % vseh prijavljenih črevesnih okužb z *E. coli*, oziroma 0,7 % vseh prijavljenih črevesnih okužb v tem obdobju (Blatnik in sod., 2002). V Sloveniji so odkrili enterohemoragične seve *E. coli* iz skupin O157, O111 in O26 (Andlovic, 2002).



Slika 5: *E. coli* O157:H7 s številnimi flagelami, posneta s transmisijskim elektronskim mikroskopom (Uzunović Kamberović, 2009)

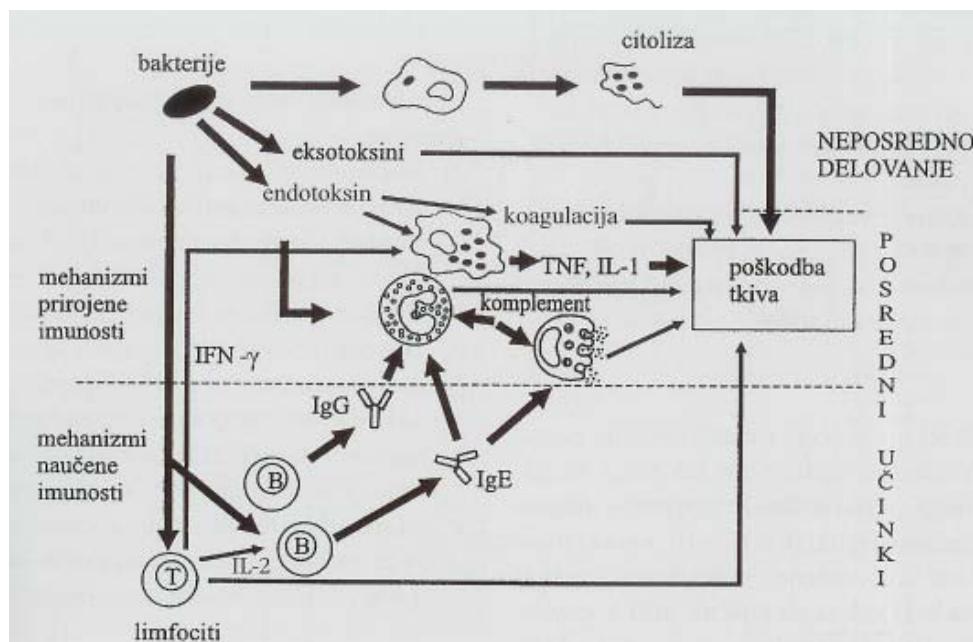
2.4 PATOGENOST IN VIRULENCA

Patogenost je sposobnost bakterij, da povzročijo bolezen pri gostitelju. Stopnjo patogenosti imenujemo virulenca. Odvisna je od virulentnih dejavnikov, ki povzročajo patološke spremembe in klinične znaake bolezni. Obstajata dve skupini virulentnih dejavnikov:

- virulentni dejavniki, ki bakterijam omogočajo kolonizacijo površin gostitelja ter invazijo v globlje ležeča tkiva in organe,
- toksini, s katerimi bakterije okvarijo gostiteljeve celice, tkiva in organe.

Poglavitne stopnje bakterijske okužbe sta vezava in kolonizacija površin gostitelja ter invazija v celice in tkiva. Vezavo omogočajo posebne površinske strukture, imenovane adhezini (Uzunović Kamberović, 2009).

Najbolje raziskani adhezini pri po Gramu negativnih bakterijah so na pilusih ali fimbrijah. Sestavljeni so iz proteina pilina, za vezavo na celice pa je ključen pilusov vrh, ki vsebuje specifične adhezinske beljakovine. Patogeneza bakterijske okužbe je kombinacija škodljivega delovanja bakterij in imunskega odziva. Bakterije se lahko naselijo v gostiteljevih celicah in jih uničijo (znotrajcelične bakterije). Celice in tkiva pa lahko propadejo tudi zaradi izločanja bakterijskih endotoksinov, ki so lipopolisaharidne sestavine bakterijske celične stene in se sprostijo po odmiranju bakterij. Eksotoksinji so beljakovine, ki jih izločajo žive bakterije, po mehanizmu delovanja in mestu učinkovanja pa obstajajo štiri vrste eksotoksinov (Koren in sod., 2002). Na spodnji shemi so prikazani splošni mehanizmi patogenih bakterij, katerih posledica so patološke spremembe.



Slika 6: Splošna shema patogenskih mehanizmov, ki privedejo do škodljivih posledic okužb (Koren in sod., 2002)

2.5 PROBIOTIKI

Iztočnico za razvoj koncepta probiotikov je prvič podal Elie Metchnikoff leta 1901. Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki zaužiti v zadostni količini pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja (FAO/WHO, 2002).

Lastnosti dobrega probiotičnega seva so: varnost, genetska stabilnost, odpornost na želodčno kislino in žolčne soli, naseljevanje gastrointestinalnega trakta, vezava na intestinalne celice, proizvodnja protimikrobnih snovi in zaviranje vezave patogenih bakterij (Vasiljevic in Shah, 2008).

Uporaba probiotikov temelji na spoznajah o pomenu določenih vrst mikroorganizmov v prebavnem sistemu za zdravje gostitelja. Probiotični mikroorganizmi morajo preživeti prehod skozi kislo okolje želodca, nato pa kolonizirati sluznico prebavil. Uspešno kolonizacijo jim otežujejo konkurenčni mikroorganizmi, ki so že v črevesju gostitelja in gibanje črevesne vsebine zaradi peristaltike. Probiotiki tekmujejo z drugimi, tudi patogenimi bakterijami, v štirih različnih mikrookoljih črevesa, in sicer na površini črevesnih epitelnih celic, v kriptah ileuma in kolona, v sluzi, ki pokriva epitel in v črevesni svetlini (Orel, 2001).

Raziskave so pokazale, da imajo različni probiotiki številne ugodne učinke za zdravje, in sicer učinkovito vplivajo na zdravljenje drisk, ki nastanejo kot posledica jemanja antibiotikov in kemoterapeutikov (infekcije z rotavirusi), izboljšajo celularno in humoralno imunost, znižajo količino neugodnih presnovkov v debelem črevesu (amonijak, prokancerogeni encimi), ublažijo jakost infekcij z bakterijo *Helicobacter pylori* (rana na želodcu in dvanajstniku) in *Clostridium difficile* (pseudomembranski kolitis), blažijo alergije, znižajo koncentracijo holesterola v plazmi, izboljšajo prebavo laktoze in ugodno vplivajo pri preventivi raka na debelem črevesju (Orel, 2001; Galdeano in sod., 2007).

Kljub vsem blagodejnim učinkom probiotikov pa moramo upoštevati tudi nekatere omejitve. Klinično najučinkovitejši probiotični sevi so pogosto tudi med najbolj fiziološko krhkimi, saj se njihova koncentracija zmanjša na vsaki stopnji proizvodnje, skladiščenja in distribucije probiotičnega proizvoda. Poleg tega pa točen mehanizem delovanja posameznega probiotičnega seva ni poznan, zato je končni izid delovanja težko predvideti (Sleator in Hill, 2008).

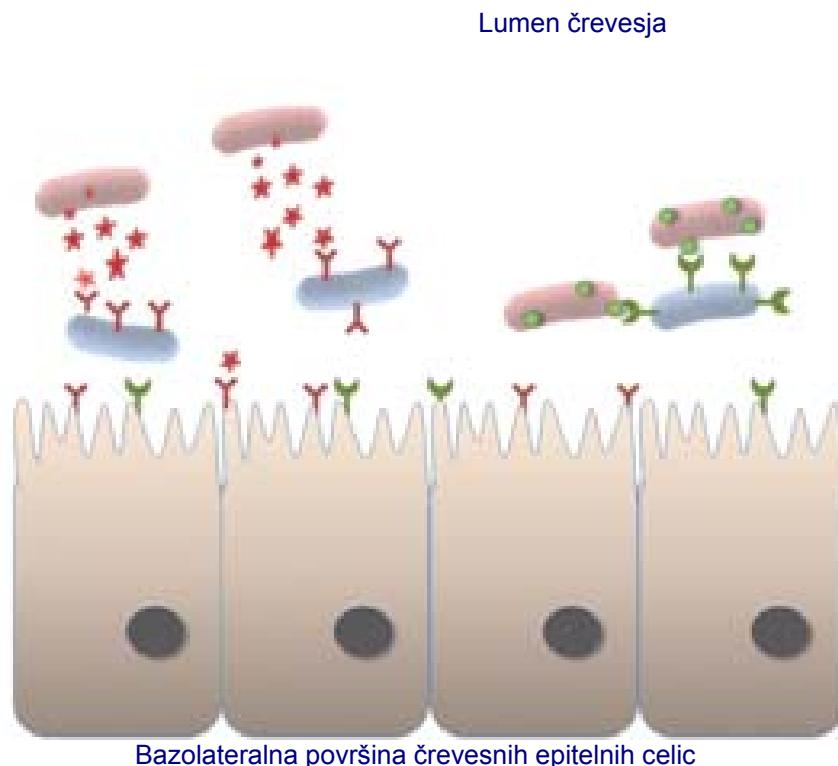
Prehranski izdelki s probiotiki so tipičen primer funkcionalne hrane, saj izbrani živi mikroorganizmi pozitivno vplivajo na ravnotežje mikrobne združbe in funkcije črevesja (Saarela in sod., 2002).

Ocenjeno je, da se trenutno v svetu prodaja približno 70 izdelkov z dodanimi probiotičnimi kulturami. Komercialne probiotične kulture najbolj pogosto dodajajo jogurtom, najdemo pa jih tudi v mleku, sadnih sokovih, sladoledu in v izdelkih, ki vsebujejo oves. Probiotični izdelki vsebujejo pretežno seve rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* (Vasiljevic in Shah, 2008), najpogosteje pa so zastopane vrste *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Enterococcus faecium* in *Bifidobacterium bifidum* (Rogelj, 1994).

Tehnologija proizvodnje izdelkov s probiotičnimi kulturami napreduje v smislu izboljšanja odpornosti probiotikov na stresne dejavnike med proizvodnjo in skladiščenjem hrane, izboljšujejo pa tudi odpornost na stresno okolje gostitelja z vidika preživetja v prebavilih in naseljevanja črevesne sluznice. Najnovejša pa je iznajdba t.i. »designer« probiotikov, ki tarčno delujejo na specifične patogene mikroorganizme ali njihove toksine ter na ta način povečajo varovalni in terapevtski učinek. Namenjeni so različnim ciljnim skupinam, kot so otroci, starostniki, nosečnice in športniki (Saarela in sod., 2002).

Njihova uporabnost se je do sedaj najbolj izkazala pri zdravljenju črevesnih okužb, vedno bolj pa je obetavna njihova uporabnost kot dodatna pomoč pri zdravljenju virusa HIV (Reid, 2008).

Paton in sod. (2000) so uspeli konstruirati rekombinant sev vrste *E. coli*, ki na svoji površini posnema receptor za toksin shiga, ki ga izloča enterotoksigena *E. coli* (STEC). Rekombinantna bakterija je v poskusu adsorbirala toksin na receptor ter ga s tem zelo učinkovito nevtralizirala, saj je aplikacija 1 mg suhe teže tega rekombinantnega seva nevtralizirala več kot 100 µg shiga toksina tipa 1 in 2 (Stx1 in Stx 2). Dokazano je bilo, da probiotične bakterije preprečujejo okužbo z enterohemoragično *E. coli* O157:H7 pri miših (Asahara in sod., 2004; Gagnon in sod., 2006; Shu in Gill, 2001), čeprav njihov mehanizem delovanja na molekularni ravni še ni popolnoma pojasnjen (Medellin in Griffiths, 2009).



Slika 7: Tarčno delovanje probiotikov na patogene bakterije ali njihove toksine (Sleator in Hill, 2008)

Najbolj raziskani so gotovo učinki probiotikov pri virusnih driskah dojenčkov. *Lb. rhamnosus* GG dokazano pomaga pri premagovanju rotavirusnih in drugih drisk. Zanimivo je, da probiotiki ne vplivajo vedno enako učinkovito na preprečevanje potovalnih drisk. Predvidevajo, da bi bilo smotrno, glede na različne povzročitelje drisk v različnih delih sveta, preskusiti tudi različne seve probiotikov (Saarela in sod., 2002).

Driska se pojavi kot stranski učinek pri približno 20 % bolnikov, ki se zdravijo z antibiotiki. Pojav driske pripisujejo uničenju normalne črevesne flore in s tem zmanjšanju naravne obrambe pred patogenimi klicami ter zmanjšani fermentacijski kapaciteti flore v kolonu (Orel, 2001).

Mnoge humane študije so pokazale blagodejen učinek probiotikov pri preprečevanju in zdravljenju akutne diareje pri otrocih (Huang in sod., 2002; Vanderhoof, 2000; Mcfarlane in Cummings, 1999).

Mnogo črevesnih patogenov izkorišča površinske celične oligosaharide gostitelja kot receptorje za svoje toksine ali adhezine, saj jim je na ta način omogočeno naseljevanje črevesne sluznice in vdor ali izločanje toksinov v gostiteljske celice. Oralno zaužiti probiotiki v črevesni svetlini vežejo in nevtralizirajo toksine ter onemogočijo kolonizacijo patogene bakterije na črevesni epitelij (Sleator in Hill, 2008).

2.6 KLASIČNE MIKROBIOLOŠKE IN MOLEKULARNE METODE KARAKTERIZACIJE PROBIOTIKOV

Pri karakterizaciji seva, vrste ali rodu probiotika se uporablja klasične mikrobiološke in molekularne metode identifikacije in tipizacije, ki temeljijo predvsem na analizi deoksiribonukleinske kisline (DNA). Sem uvrščamo hibridizacijsko in restrikcijsko analizo, različne izvedbe verižne reakcije s polimerazo (PCR) v kombinaciji z elektroforetskimi tehnikami, ugotavljanje nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNA in metodo gelske elektroforeze v utripajočem polju (PFGE).

Pri ugotavljanju adhezivnosti in sposobnosti kolonizacije črevesne sluznice probiotikov, se pogosto poslužujejo *in vitro* testiranja adhezivnih lastnosti na humanih črevesnih celičnih linijah (Caco-2, HT-29) v kombinaciji z merjenjem radioaktivnosti, mikroskopiranjem ali pretočno citometrijo.

Preživelost probiotikov v prebavnem traktu lahko ovrednotimo s kvalitativnimi in kvantitativnimi klasičnimi mikrobiološkimi gojitvenimi tehnikami na selektivnih gojiščih, biokemijskimi testi ter s kombiniranjem imunskih testov s specifičnimi monoklonskimi protitelesi.

Inhibicijo patogenih bakterij pa lahko ugotovimo s pomočjo *in vitro* testiranj sinteze protimikrobnih snovi, z molekularnimi metodami identifikacije in tipizacije izolatov ter s hibridizacijo *in situ* v kombinaciji s fluorescentno mikroskopijo ali pretočno citometrijo (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Ugotovili so, da številnih sevov in celo vrst laktobacilov na osnovi fenotipskih lastnosti ni mogoče razlikovati. Zato so potrebne molekularne metode identifikacije in tipizacije bakterijskih sevov, saj so se te pokazale kot bolj dosledne, hitre, zanesljive ter zmožne razlikovati tudi med bližnjimi sorodnimi vrstami (Singh in sod., 2009).

Med molekularnimi metodami imajo prednost tiste, ki vključujejo analizo DNA, saj je ta manj odvisna od okoljskih dejavnikov kot ostale sestavine mikrobnih celic. DNA za analizo lahko osamimo iz bakterijskih celic v celoti ali le različne dele genoma, kot je samo kromosomska ali samo plazmidna DNA (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Poznane so različne izvedbe PCR ter kombinacije z drugimi molekularnimi metodami. Za kvantifikacijo probiotičnih sevov v črevesu ali vzorcih blata lahko uporabimo kompetitivni PCR (c-PCR), saj omogoča kvantifikacijo bakterij preko ugotavljanja koncentracije specifičnih tarčnih odsekov DNA. Najpopolnejšo nadaljnjo analizo pomnožkov PCR predstavlja ugotavljanje nukleotidnega zaporedja pomnožkov, imenovano sekvenciranje (Singh in sod., 2009; Smole Možina in Jeršek, 2001).

2.6.1 RAPD PCR za detekcijo *Lb. gassseri* K7 (Rif^r)

Metoda RAPD PCR (randomly amplified polymorphic DNA) je verižna reakcija s polimerazo, kjer z nespecifičnimi začetnimi oligonukleotidi naključno pomnožujemo polimorfno DNA v manj strogih pogojih pomnoževanja. Rezultat takšnega pomnoževanja je značilen vzorec odsekov DNA (Vogel, 1996). Prednost tehnike je, da ni potrebno poznavanje specifičnih začetnih zaporedij pomnoževanja, saj se uporablja naključno izbrani začetniki, dolgi približno 10 do 15 nukleotidov, kateri najdejo več komplementarnih zaporedij v preiskovanem genomu. Tehnika omogoča razlikovanje sevov iste vrste, slabost pa je slaba ponovljivost rezultatov (Smole Možina in Jeršek, 2001). Zanimiv način odpravljanja neponovljivosti rezultatov omogoča TAP-PCR (triplet arbitrarily primed PCR), ki obsega tri reakcije pomnoževanja pri različnih temperaturah prileganja začetnih oligonukleotidov ter omogoča hitro prepoznavanje nespecifičnih pomnožkov (O'Sullivan in Kullen, 1998).

2.7 METODE IDENTIFIKACIJE *Escherichia coli*

Osamljene seve lahko identificiramo s pomočjo biokemijskih testov in ugotavljanja seroloških skupin O (serotipizacija), kjer jih z določeno verjetnostjo uvrstimo v posamezne enterovirulentne skupine. Različne tipe enterovirulentnih sevov lahko potrdimo z biološkimi, imunološkimi (ELISA, radioimunološko označevanje) in molekularnimi metodami. Najpogosteje se biološki vzorec najprej cepi na trdno gojišče MacConkey s sorbitolom (Andlovic, 2002).

Molekularne metode so najbolj zanesljive med tehnikami pri identifikaciji patogenih sevov *E. coli* v bioloških vzorcih. Med njimi se uporablajo hibridizacijske tehnike, kjer s pomočjo DNA-sonde odkrivajo prisotnost genov za termolabilne in termostabilne enterotoksine seva ETEC. Poznamo dva tipa DNA-sond, in sicer oligonukleotidne ali polinukleotidne (fragmentne sonde). Oligonukleotidna sonda je pridobljena na podlagi zaporedja DNA tarčnega gena, fragmentne sonde pa iz genov, ki kodirajo točno določen fenotip.

Zelo zanesljive rezultate dajejo tudi različne izvedbe PCR, kot je na primer reakcija multiplex PCR (Nataro in Kaper, 1998).

Patogene seve *E. coli* lahko od nepatogenih ločimo na podlagi prisotnosti virulenčnih genov, ki nosijo zapis za adhezivnost in kolonizacijo, invazivnost, površinske molekule in izločanje. Virulenčni geni se lahko nahajajo na kromosomih, plazmidih ali fagih ter se pogosto prenašajo med različnimi sevi *E. coli* (Palaniappan in sod., 2006).

2.7.1 Multiplex PCR za detekcijo *E. coli* O157:H7

Za ugotavljanje prisotnosti seva O157:H7 v vzorcih blata in organih živali se je kot zelo uporabna pokazala metoda multiplex PCR, ki učinkovito detektira gene, značilne za sev O157:H7.

Obstaja mnogo različic PCR, kjer se uporablajo oligonukleotidni začetniki, prirjeni genomu seva O157:H7. Običajni tarčni geni za identifikacijo EHEC, so protein intimin (*eaeA*), 1-fosfat dehidrogenaza (*gatD*) in geni za zapis O157 lipopolisaharidnega O-antigena. Pri uporabi enega samega para oligonukleotidnih začetnikov v reakciji PCR obstaja namreč tveganje, da analiza ne bo dovolj specifična. Zato uporaba večih setov začetnih oligonukleotidov v isti reakciji PCR (reakcija multiplex PCR) znatno poveča zanesljivost detekcije *E. coli* O57:H7. Tak pristop je uporaben zlasti pri analiziranju večjega števila vzorcev, kjer iščemo potencialno pozitivne rezultate, katere lahko naknadno potrdimo tudi z metodo imunomagnetnega ločevanja (IMS).

Al-Ajmi in sod. so sestavili tri sete oligonukleotidnih začetnikov, specifičnih za gene *rfbE*, *uidA* in *fliC*. Dokazali so, da lahko s kombiniranjem teh začetnikov specifično detektirajo sev O157:H7 v vzorcih blata govedi. Za enostavno ločevanje in detekcijo pomnožkov PCR se običajno uporablja klasična gelska elektroforeza (Al-Ajmi in sod., 2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

V poskus, ki je trajal 28 dni je bilo vključenih 50 mišk. Potek poskusa je shematsko prikazan na sliki 8.

Vzorce blata, vsebine črevesa in organe smo ustreznno razredčili in homogenizirali ter nacepili na gojišča:

- Gojišče za koliformne bakterije (Chromocult)
- Gojišče za *Escherichia coli* O157:H7 (Fluorocult)
- Gojišče za laktobacile (MRS)
- Gojišče za *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif^r) (MRS + rifampicin)

Gojišča smo inkubirali 24 ur pri 37 °C za koliformne bakterije in *E. coli* ter 72 ur pri 37 °C (anaerobno) za laktobacile.

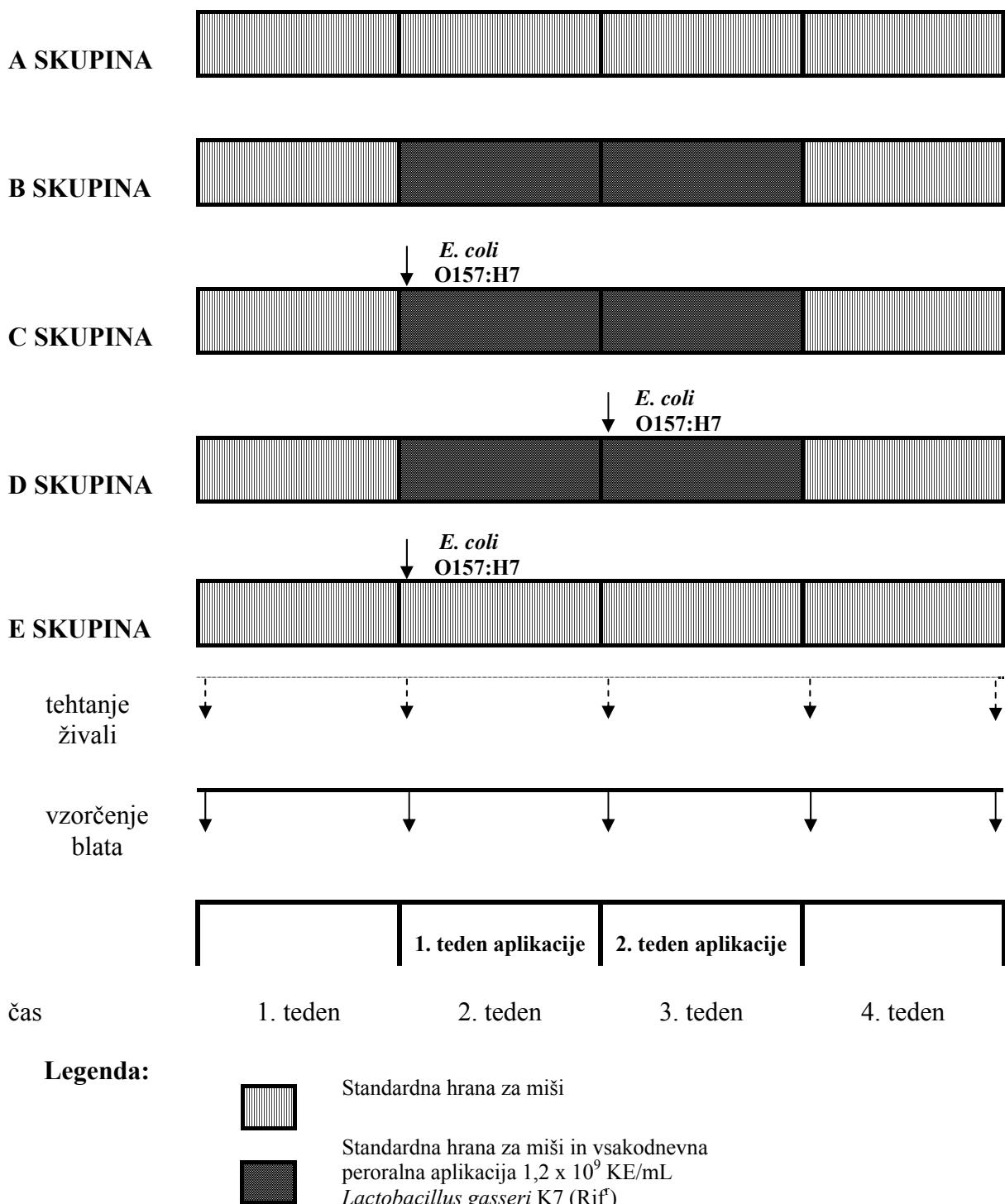
Za detekcijo K7 (Rif^r) smo na gojišču MRS z rifampicinom prešteli značilne kolonije ter jih nato nekaj z vsake plošče prenesli v tekoče gojišče MRS. Inkubirali smo 48 ur pri 37 °C. Na ta način smo pridobili čisto kulturo.

S površine gojišča za *E. coli* pa smo sprali vse zrasle kolonije. Očiščene izolate K7 (Rif^r) ter celokupno populacijo *E. coli* smo do nadaljnje analize shranjevali na -20 °C.

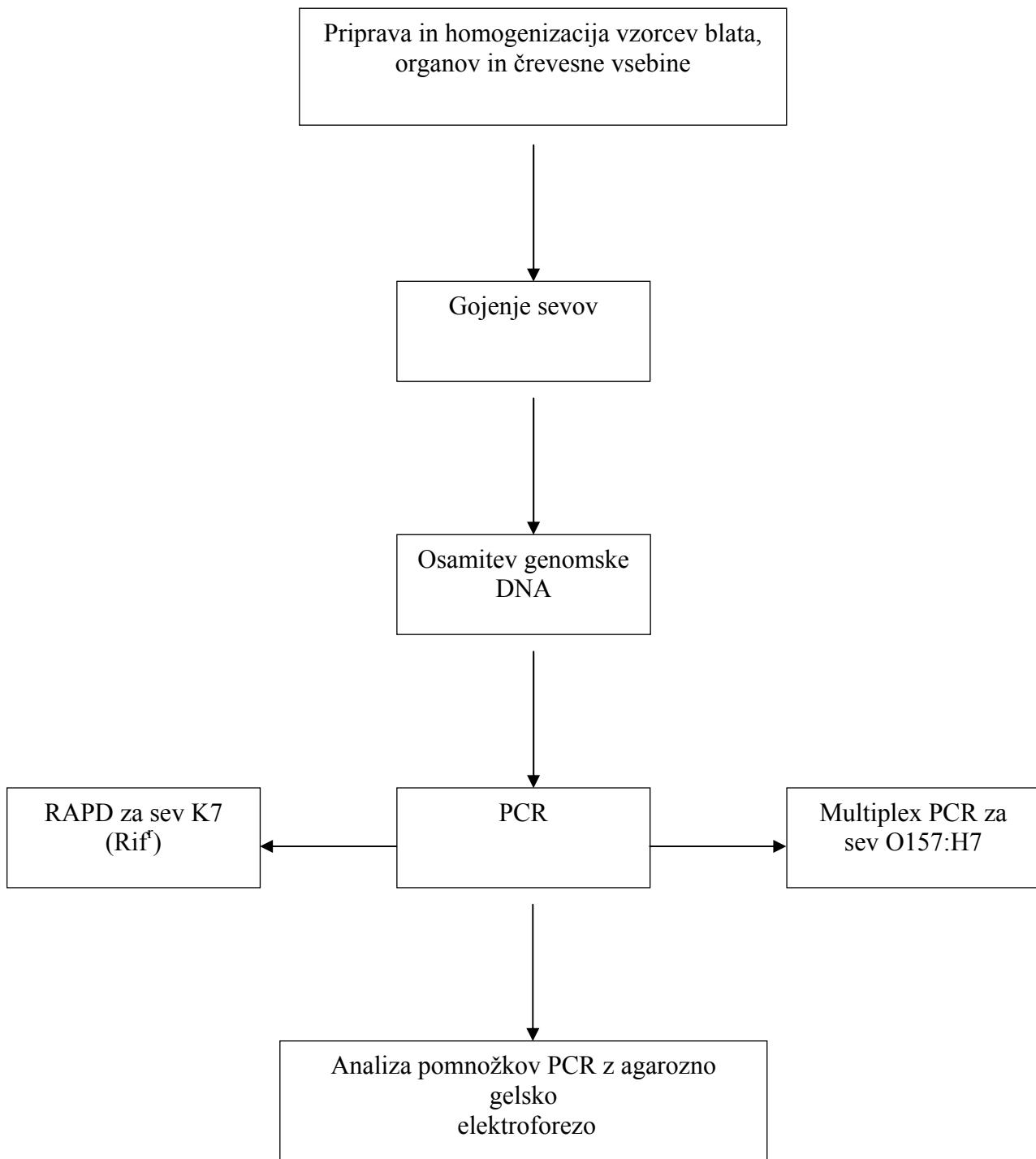
Za detekcijo serotipa EHEC O157:H7 v blatu, organih in črevesni vsebini smo uporabili reakcijo multiplex PCR, s katero smo ugotavljali prisotnost genov z zapisi za toksine SLT (shiga like toxin), specifične za to serološko skupino.

Sev *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) smo dokazovali z metodo RAPD.

DNA posameznih kolonij K7 (Rif^r) oziroma celokupne populacije *E. coli* smo predhodno osamili s komercialnim kitom za izolacijo genomske DNA, pomnožke verižne reakcije s polimerazo pa smo analizirali s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. Potek raziskave je prikazan na sliki 9.



Slika 8: Prikaz poskusa



Slika 9: Potek dela od priprave vzorcev do analize pomnožkov PCR

3.2 MATERIALI

3.2.1 Laboratorijske miši in krma

Miši seva C57BL/6J smo dobili na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo medicinskega eksperimentalnega centra (Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija). Za hranjenje živali smo uporabili standardno krmo za miši v obliki peletov (Altromin, Nemčija).



Slika 10: Testne miši C57BL/6J

3.2.2 Bakterijski sevi

Preglednica 4: Bakterijski sevi, uporabljeni v poskusu

SEV	VIR
<i>Lb. gasseri</i> K7 (Rif ^r)	Zbirka Katedre za mlekarstvo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija
<i>E. coli</i> O157:H7	Zbirka Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

3.2.3 Vzorci

V raziskavi so bili skupno analizirani 504 vzorci, ki so vključevali: blato, črevesno vsebino in organe miši. Od tega smo pri 227 vzorcih ugotavljali prisotnost *E. coli* O157:H7, pri 277 vzorcih pa avtentičnost *Lb. gasseri* K7 (Rif^r). Vzorce smo shranili v sterilne centrifugirke in jih zamrznili na – 70 °C.

3.2.4 Gojišča in raztopine

3.2.4.1 Trdno gojišče za koliformne bakterije (Chromocult® Coliform Agar)

Gojišče smo uporabili v mikrobioloških analizah za določanje števila kolonijskih enot (KE) koliformnih bakterij. Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Gojišča nismo avtoklavirali, ampak smo ga pripravili s segrevanjem v mikrovalovni pečici, ga ohladili na približno 45 °C in razlili na petrijeve plošče.

3.2.4.2 Trdno gojišče za *E. coli* O157:H7 (Fluorocult® *E.coli* O157:H7 Agar)

Diferencialno trdno gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), ga razdelili v stekleničke (po 200 mL) ter avtoklavirali 15 min pri 115 °C. Uporabili smo ga za selekcijo enterohemoragičnega seva *E. coli* O157:H7 (Heizmann, 1988).

3.2.4.3 Gojišče za laktobacile (MRS)

Trdno hranljivo gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Zatehtali smo 66,2 g MRS gojišča v prahu ter ga s segrevanjem raztopili v 1 L destilirane vode. Gojišče smo razdelili v stekleničke (po 200 mL) ter avtoklavirali 15 min pri 115 °C. Pred razlivanjem smo ga ohladili na 45 °C. Tako pripravljeno gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktobacilov.

3.2.4.4 Gojišče za *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) (MRS+rif)

Trdno hranljivo gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), ga razdelili v stekleničke (po 200 mL) ter avtoklavirali 15 min pri 115 °C. Ohlajenemu gojišču (45 °C) smo pred razlivanjem na plošče dodali raztopino antibiotika rifampicina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija) v koncentraciji 120 µg/mL (1 mL založne raztopine/100 mL gojišča, ki smo jo pripravili v koncentraciji 12 mg rifampicina/mL etanola). Antibiotik smo shranjevali na -20 °C. Gojišče MRS z dodanim rifampicinom smo uporabilli za selektivno štetje proti rifampicinu odpornega seva *Lb. gasseri* K7 (Rif^r).

3.2.4.5 Tekoče gojišče MRS

Tekoče gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija), ga razdelili v epruvete (po 10 mL) ter ga avtoklavirali 15 min pri 115 °C. Tekoče gojišče smo uporabili za namnoževanje laktobacilov.

3.2.4.6 Fiziološka raztopina

S pomočjo Ringerjevih tablet smo po navodilih proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija) pripravili ¼ Ringerjeve raztopine. V epruvete smo razdelili po 9,4 mL raztopine ter jih avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Raztopino smo uporabljali za razredčevanje po Kochu, pri spiranju zraslih kolonij s površine gojišč ter pri aplikaciji bakterijskih sevov mišim.

3.2.4.7 Pufer TAE (TRIS acetatni pufer)

Iz 242 g Tris baze (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija), 57,1 mL ledocetne kisline (Fluka, Buchs, Švica) in 100 mL 0,5 M EDTA (Sigma – Aldrich Chemie, Steinheim, Nemčija), smo pripravili 50-kratno založno raztopino. Pred uporabo smo raztopino razredčili z vodo v razmerju 1:50.

1-kratni pufer TAE smo uporabljali pri analizah pomnožkov PCR s pomočjo gelske elektroforeze.

3.2.5 Kemikalije

3.2.5.1 PCR

- 0,1 mM dNTP (Promega, Madison, WI, ZDA)
- 5x zeleni GoTaq pufer za polimerazo z 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA)
- 5x zeleni GoTaq Flexi pufer za polimerazo brez MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA)
- 25 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA)
- GoTaq DNA polimeraza (Promega, Madison, WI, ZDA)
- Začetni oligonukleotidi: (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija)

- za *Escherichia coli* O157:H7 (Fratamico in sod., 1995):

10 µM MS1F (5'-ACGATGTGGTTATTCTGGA-3')
10 µM MS1R (5'-CTTCACGTCACCATACTAT-3')
10 µM MK-1 (5'-TTTACGATAGACTTCTCGAC-3')
10 µM MK-2 (5'-CACATATAAATTATTCGCTC-3')
10 µM AE 19 (5'-CAGGTCGTCGTCTGCTAAA-3')
10 µM AE 20 (5'-TCAGCGTGGTTGGATCAACCT-3')

- za RAPD (Torriani in sod., 1999):

10 µM M-13 (5'-GAGGGTGGCGGGTTCT-3')

- Pozitivna kontrola za *E. coli* O157:H7, reprezentativni sev iz zbirke Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija
- Pozitivna kontrola za *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif), IM 238, sev iz zbirke Katedre za mlekarstvo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija.

3.2.5.2 Elektroforeza in barvanje

- 1-kratni pufer TAE
- Barvilo Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen, ZDA)
- Agaroza (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- Molekularni označevalec velikosti 100 bp (100 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva)
- Molekularni označevalec velikosti 1000 bp (1000 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva)

3.2.5.3 Osamitev DNA

- komercialni set za izolacijo genomske DNA – Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, ZDA)
- izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 70 % (v/v) etanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- 50 mM EDTA (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)

3.3 METODE

3.3.1 Živali in krmljenje

V poskus je bilo vključenih 50 miši, starih osem tednov.

Poskus je bil razdeljen na dva dela, in sicer na obdobje prilagajanja (7 dni) in poskusno obdobje (21 dni).

Živali so bile hranjene 28 dni s standardno krmo za miši v obliki peletov *ad libitum* in imele ves čas dostop do vode.

Živali smo naključno razdelili v pet skupin po deset živali, nastanjenih v skupinah po pet živali v kletki. Označitev kletk je prikazana v preglednici 5.

Preglednica 5: Nastanitev miši v pet skupin in označitev kletk

Skupina miši	A		B		C		D		E	
Oznaka kletke	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D1	E1	E2
Št. kletke	kletka 1	kletka 2	kletka 3	kletka 4	kletka 5	kletka 6	kletka 7	kletka 8	kletka 9	kletka 10



Slika 11: Nastanitev miši v pet skupin (A, B, C, D, E) po 10 živali

Kontrolna skupina (A) mišk je od 8. do 21. dneva peroralno dobivala 200 µL fiziološke raztopine. Druga (B), tretja (C) in četrta skupina (D) so od 8. do 21. dneva enkrat dnevno prejemale $1,2 \times 10^9$ KE/mL probiotične bakterije *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif^r). Tretji (C) in peti (E) skupini (8. dan poskusa) ter četrti (D) skupini (15. dan poskusa) smo dali 1×10^9 KE/mL *E. coli* O157:H7, s čimer smo inducirali intragastrično okužbo.

Celice K7 (Rif^r) in EHEC O157:H7 smo dajali živalim suspendirane v 200 µL fiziološke raztopine s pomočjo sonde direktno v usta, kar prikazuje slika 12.



Slika 12: Aplikacija testnih sevov mišim direktno v usta s pomočjo sonde

3.3.2 Vzorčenje

Blato miši je bilo vzorčeno na dan vhlevitve ter 7., 14., 21. in 28. dan poskusa. Po poskusu so bile živali evtanazirane z izpostavitevijo ogljikovemu dioksidu. Ob žrtvovanju so bili za nadaljnje preiskave živalim odvzeti vzorci organov (tanko črevo, debelo črevo, slepo črevo, želodec, jetra, ledvice, vranica, bezgavke) ter vzorci vsebine tankega, debelega in slepega črevesa.

Na sliki 13 je prikazano vzorčenje blata.



Slika 13: Vzorčenje blata

3.3.2.1 Homogenizacija blata, organov in črevesne vsebine

Vzorce blata smo s pomočjo dodajanja fiziološke raztopine razredčili do 10^{-2} in jih homogenizirali na vrtičniku (Vortex) ali s pomočjo pipetiranja. Vzorce organov smo iz zamrzovalnih posodic prenesli v centrifugirke (12 mL), ki smo jih predhodno stehtali ter dodali 3 mL fiziološke raztopine.

Vzorce črevesne vsebine smo pripravili tako, da smo celotno vsebino črevesja prenesli v centrifugirko in ji dodali 10 mL fiziološke raztopine.

Vranico, ledvice in jetra smo homogenizirali s pomočjo paličnega mešalnika.

Dele tankega, debelega in slepega črevesa, želodec ter bezgavke pa smo prestavili v stekleno epruveto ter homogenizirali s teflonskim batom (Ultraturax). Da bi ostalo čim več bakterijskih celic nepoškodovanih, je homogenizacija potekala pri najnižjih obratih.

Vzorce smo ustrezno razredčili s pomočjo fiziološke raztopine, celoten postopek priprave pa je potekal v aseptičnih pogojih.

3.3.3 Klasična mikrobiološka tehnika gojenja

Po 0,1 mL homogeniziranih vzorcev organov in črevesne vsebine smo v dveh paralelkah razmazali po gojišču Chromocult za koliformne bakterije in Fluorocult za *E.coli* O157:H7. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37 °C v aerobnih pogojih. Po inkubaciji smo opazovali izrasle kolonije. Ugotovili smo, da bakterijski sev *E. coli* O157:H7 v prisotnosti drugih bakterij vrste *E. coli* ne tvori kolonij tipičnega izgleda, na podlagi česar bi kolonije tega seva lahko razločevali od ostalih kolonij, zato selektivno štetje kolonij *E. coli* O157:H7 ni bilo mogoče. Po navodilih proizvajalca gojišča Fluorocult, so kolonije *E.coli* O157:H7 rumene in ne fluorescirajo, če jih osvetlimo z UV žarki. V predposkusih smo ugotovili, da kolonije kažejo tipičen izgled le v primeru, da smo nacepili čisto kulturo, ne pa v mešanici z drugimi sevi *E. coli*. Zato smo vse zrasle kolonije s fiziološko raztopino sprali s površine plošč z razredčitvijo 10⁻³ ter po 1 mL prenesli v mikropruvete.

Po 1 mL homogeniziranega vzorca smo odpipetirali na petrijeve plošče v dveh paralelkah in jih prelili z gojiščem MRS in MRS z dodanim antibiotikom rifampicinom (120 µg/mL gojišča). Plošče smo inkubirali 72 ur pri 37 °C v anaerobnih pogojih, ki smo jih dosegli z uporabo izdelka GENbox anaer (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Po inkubaciji smo opazovali izrasle kolonij. Posamezne zrasle kolonije seva K7 (Rif^r) smo z gojišča MRS+rif s pomočjo cepilne zanke vcepili v 1 mL bujona MRS v mikropruvetah ter inkubirali 48 ur pri 37 °C.

Vzorce smo do nadaljnje analize shranjevali na -20 °C.

Po inkubaciji smo zrasle bakterijske kolonije na petrijevih ploščah prešteli s pomočjo elektronskega števca kolonij (EŠKO 7L, Labo, Ljubljana).

Pri klasični mikrobiološki tehniki gojenja gre za ugotavljanje koncentracije mikroorganizmov v vzorcih na podlagi primerne razredčitve osnovnega vzorca in gojenjem le tega na primernem selektivnem gojišču, ob predpisanih optimalnih pogojih. Sama selektivnost gojišča je zelo pomembna, saj je s predpisanimi dodatki v gojišče zagotovljena rast le želeni bakterijski vrsti ali skupini (Mullan, 2002). Število kolonijskih enot (KE) bakterij v gramu ali mililitru izhodnega vzorca izračunamo po formuli:

$$KE = \sum n / ((f_a \cdot 1 + f_b \cdot 0,1) \cdot d) \quad \dots(1)$$

Legenda: $\sum n$ – vsota vseh kolonij izraslih na števnih ploščah
 f_a – število števnih plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi
 f_b – število števnih plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi
 d – recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

3.3.4 Statistična obdelava podatkov

Podatke o rasti bakterij (izoliranih iz blata) na posameznih gojiščih, ki smo jih dobili v poskusu, smo uredili s programom Microsoft Excel v okolju Windows. Tako pripravljene smo statistično obdelali s programskim paketom SAS/STAT (SAS Institute, 2001). Za analizo smo uporabili proceduro MEANS (za izračun osnovnih statističnih parametrov) in proceduro GLM – metoda splošnih linearnih modelov (za ovrednotenje posameznih vplivov oziroma testiranje modela).

Za določitev statistično značilnih razlik v rasti bakterij na posameznih gojiščih smo uporabili statistični model, v katerega smo vključili vpliv časa poskusa, skupine mišk ter njun skupni vpliv. Za zagotovitev čim večjega števila opazovanj, smo namesto povprečij ponovitev vključili posamezne ponovitve. Podatke smo statistično obdelali pri stopnji tveganja $\alpha = 5\%$. Uporabljeni model je prikazan v enačbi 2.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + TS_{ij} + e_{ijk} \quad \dots(2)$$

kjer je:

Y_{ijk} – opazovana lastnost

μ – srednja vrednost

T_i – čas poskusa; $i = 1, 2, 3, 4$

S_j – skupina mišk; $j = 1, 2, 3, 4, 5$

TS_{ij} – skupni vpliv časa in skupine

e_{ijk} – ostanek

3.3.5 Identifikacija bakterij

3.3.5.1 Osamitev DNA za ugotavljanje prisotnosti *E. coli* O157:H7

- DNA smo osamili iz 24-urne kulture. Kolonije, zrasle na površini gojišča Fluorocult (razredčitev 10^{-3}) smo s pomočjo pipetiranja s fiziološko raztopino sprali in nato 1 mL suspenzije celic prenesli v mikropruvete.
- Kulturo smo centrifugirali pri 13000 g, 2 min ter odlili supernatant.
- Usedlini smo dodali 600 μL Nuclei Lysis Solution in jo s pipetiranjem resuspendirali.
- Mikropruvete smo prenesli v kopel (80°C , 5 min) ter jih nato ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 3 μL RNA-se Solution ter vsebino mikropruvet premešali s počasnim obračanjem.
- Mikropruvete smo inkubirali 30 min na 37°C ter jih nato ohladili na sobno temperaturo.

- Dodali smo 200 µL Protein Precipitation Solution in mikropruvete močno mešali 20 s na vrtičniku (Vortex), nato pa ohladili na ledu (5 min).
- Centrifugirali smo 3 min pri 14000 g.
- V nove mikropruvete smo odpipetirali 600 µL izopropanola, mu dodali supernatant in vsebino premešali z obračanjem mikropruvet.
- Ponovno smo centrifugirali 2 min pri 14000 g in poskusili čim bolj odstraniti supernatant.
- Usedlini smo dodali 600 µL 70 % (v/v) etanola ter mešali z obračanjem mikropruvet.
- Še zadnjič smo centrifugirali 2 min pri 14000 g, odlili etanol in posušili mikropruvete v inkubatorju.
- Dodali smo 100 µL DNA Rehydration Solution in inkubirali mikropruvete 1 h na 65 °C.
- Osamljeno DNA smo hranili pri -20 °C.

3.3.5.2 Osamitev DNA za ugotavljanje prisotnosti *Lb. gasseri* K7 (Rif^r)

- Za osamitev DNA smo uporabili 48 urno kulturo, ki smo jo namnožili v 1 mL tekočega gojišča MRS pri 37 °C v mikropruvetah.
- Kulturo smo centrifugirali pri 13000 g, 2 min ter odlili supernatant.
- Lizocim smo raztopili v 50 mM EDTA (10 mg lizocima/mL EDTA), odpipetirali 600 µL te raztopine k usedlini v mikropruveti in jo resuspendirali.
- Usedlini smo dodali še 600 µL Nuclei Lysis Solution in jo s pipetiranjem resuspendirali.
- Mikropruvete smo prenesli v kopel (80 °C, 5 min) ter jih nato ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 3 µL RNA-se Solution ter premešali vsebino mikropruvet s počasnim obračanjem.
- Mikropruvete smo inkubirali 30 min na 37 °C ter jih nato ohladili na sobno temperaturo.
- Dodali smo 200 µL Protein Precipitation Solution in vsebino mikropruvet močno mešali 20 s na vrtičniku (Vortex), nato pa hladili na ledu (5 min).
- Centrifugirali smo 3 min pri 14000 g.
- V nove mikropruvete smo odpipetirali 600 µL izopropanola, mu dodali supernatant in vsebino premešali z obračanjem mikropruvet.
- Ponovno smo centrifugirali 2 min pri 14000 g in poskusili čim bolj odstraniti supernatant.
- Usedlini smo dodali 600 µL 70 % (v/v) etanola ter mešali z obračanjem mikropruvet.
- Še zadnjič smo centrifugirali 2 min pri 14000 g, odlili etanol in posušili mikropruvete v inkubatorju.
- Dodali smo 100 µL DNA Rehydration Solution in inkubirali mikropruvete 1 h na 65 °C.
- Osamljeno DNA smo hranili pri -20 °C.

3.3.5.3 Multiplex PCR

Metodo PCR je leta 1983 zasnoval ameriški biokemik Kary Mullis, za kar je leta 1993 prejel Nobelovo nagrado za kemijo. Ključne stopnje analize vzorca z metodo PCR so priprava DNA, priprava in izvedba PCR ter analiza pomnožkov.

Dvoverižna molekula DNA se pri temperaturi okoli 94 °C loči na posamezni verigi. Ustrezno nižja temperatura (50 °C do 70 °C) omogoča prileganje začetnih oligonukleotidov na enojne tarčne verige. Encim Taq polimeraza nadaljuje sintezo komplementarnih verig v regiji med obema začetnima oligonukleotidoma. V vsakem ciklu so nastale dvoverižne kopije matrica v naslednjem ciklu pomnoževanja, kar pomeni, da se pri vsaki ponovitvi število kopij pomnoževanega odseka podvoji. Običajna verižna reakcija s polimerazo vključuje 20 do 30 ciklov pomnoževanja, pri čemer dobimo iz ene kopije DNA teoretično več kot milijon kopij.

Prednost molekularnih testov, ki vključujejo verižno reakcijo s polimerazo, se kaže v boljši specifičnosti in občutljivosti v primerjavi s konvencionalnimi mikrobiološkimi metodami (Old in Primrose, 1994; Smole Možina, 2003).

Analiza multiplex PCR omogoča, da v eni sami reakciji pomnožujemo več fragmentov (lokusov) na tarčni DNA s pomočjo več parov začetnih oligonukleotidov hkrati (Henegariu, 1997).

V literaturi je multiplex PCR opisana kot zelo specifična, občutljiva in hitra metoda za detekcijo zaporedja *eaeA* ter toksina SLT I in II (shiga like toxin), ki ga proizvaja *E. coli* O157:H7. Zato se ta metoda pogosto uporablja v klinični diagnostiki pri odkrivanju enterohemoragične *E. coli* v vzorcih blata in hrane. Za čim večjo občutljivost analize multiplex PCR pa je potrebno ustrezno prilagoditi pogoje reakcije (Fratamico in sod., 1995; Al-Ajmi in sod., 2005).

Za reakcijo multiplex PCR smo uporabili tri sete začetnih oligonukleotidov. Sestava reakcijske mešanice je prikazana v preglednici 6, v preglednici 7 pa je naveden program za multiplex PCR.

Preglednica 6: Sestava 20 µL reakcijske mešanice za analizo multiplex PCR

REAGENT	V (µL)
dNTP (0,1 mM)	0,2
5X Go-Taq pufer z MgCl ₂ (25mM)	4
z. o. 1 (10 µM)	0,2
z. o. 2 (10 µM)	0,2
z. o. 3 (10 µM)	0,2
z. o. 4 (10 µM)	0,2
z. o. 5 (10 µM)	0,2
z. o. 6 (10 µM)	0,2
GoTaq polimeraza (5 U/µl)	0,1
H ₂ O	13,5
DNA	1

z.o. - začetni oligonukleotid

Preglednica 7: Protokol analize multiplex PCR

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
35	Denaturacija DNA	95 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	48 °C	1 min
	Podaljševanje verige	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	10 min

Pomnožke multiplex PCR smo analizirali z gelsko elektroforezo (poglavlje 3.3.5.5) v 1,8 % agaroznem gelu.

3.3.5.4 RAPD

Metode odkrivanja in identifikacije bakterij na osnovi PCR praviloma ne razlikujejo sevov iste vrste. Izjema je analiza RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) ozziroma verižna reakcija s polimerazo z naključno izbranimi začetnimi oligonukleotidi (Williams in sod., 1990). Prvič je bila opisana leta 1990, ko so uporabili kot genetski označevalce začetni oligonukleotid dolžine 9 do 10 nukleotidov, (Lawrence in sod., 1993). Je učinkovita metoda tudi za ločevanje sevov znotraj rodu *Lactobacillus* (Du Plessis in Dicks, 1995).

Metoda RAPD je tehnika, pri kateri se lahko uporablja en sam ali več naključno izbranih začetnih nukleotidov hkrati. Osnovana je na pomnoževanju večjega števila različnih nukleotidnih zaporedij na tarčni DNA z naključno izbranimi (nespecifičnimi) začetnimi oligonukleotidi. Pomembno je le, da se začetni oligonukleotid veže na nasproti si orientirani mesti prileganja na tarčni DNA. Mesti morata ležati dovolj blizu (cca. 2000 bp). Najpogosteje se uporablajo desetmerne enote, literatura pa navaja tudi uporabo naključno izbranih začetnih oligonukleotidov dolžine 5 do 24 nukleotidov (Caetano-Anolles, 1993).

Metoda se uspešno uporablja tudi za pridobivanje genomskega »fingerprintov« ozziroma »prstnih odtisov« laktobacilov (Torriani in sod., 1999).

Pomnožke PCR je najenostavnejše analizirati z agarozno elektroforezo, in sicer tako, da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi odsekov DNA (Smole Možina in Jeršek, 2001).

Za analizo RAPD za dokazovanje *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif^r) smo uporabili reakcijsko mešanico, s podatki v preglednici 8. Reakcija je potekala pri pogojih, navedenih v preglednici 9.

Preglednica 8: Sestava 20 µL reakcijske mešanice za analizo RAPD

REAGENT	V (µL)
dNTP (0,1 mM)	0,2
5x Go-Taq Flexi pufer	4
MgCl ₂ (25 mM)	3,2
z. o. 1 (10 µM)	0,2
GoTaq polimeraza (5 U/µl)	0,1
H ₂ O	11,3
DNA	1

z.o. - začetni oligonukleotid

Preglednica 9: Protokol analize RAPD

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	3 min
40	Denaturacija DNA	95 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	45 °C	20 s
	Podaljševanje verige	72 °C	2 min
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min

Pomnožke RAPD smo ločevali z gelsko elektroforezo (poglavlje 3.3.5.5) na 1,8 % agaroznem gelu.

3.3.5.5 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozni gel smo pripravili iz TAE pufra in agaroze. V mikrovalovni pečici smo raztopino segrevali do stopnje, ko je ta postala bistra in homogena. Agarozno raztopino smo nato ohlajeno vlili v model z glavniki. Počakali smo, da se je gel strdil, nakar smo ga potopili v TAE pufer v posodi za elektroforezo. Iz gela smo odstranili glavnike ter v žepke nanesli po 10 µL pomnožkov PCR ter pozitivno in negativno kontrolo. V prvi in zadnji žepek pa smo nanesli po 3,5 µL molekularnega označevalca (1000 bp za pomnožke RAPD in 100 bp za pomnožke multiplex PCR). Elektroforeza je potekala pri 70 V, 135 min za ločevanje pomnožkov RAPD in pri 100 V, 80 min za ločevanje pomnožkov multiplex PCR.

Po končani elektroforezi smo gel potopili v barvilo Sybr Safe (10 µL barvila/100 mL pufra) za 30 min. Nato smo ga prenesli v UV-transiluminator in pri valovni dolžini 254 nm pregledali ter posneli sliko.

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE ŠTEVILA BAKTERIJ V VZORCIH BLATA, ORGANIH IN ČREVESNE VSEBINE TER POTRDITEV SEVOV PRISOTNIH BAKTERIJ

Poskus je bil razdeljen na dva dela, in sicer na obdobje prilagajanja (7 dni) in poskusno obdobje (21 dni). Vzorci blata miši so bili odvzeti na dan vhlevitve in 7., 14., 21. in 28. dan poskusa, nato so bile miši žrtvovane. Shranjeni so bili vzorci črevesa, črevesne vsebine in organov. Vzorce blata, organov in črevesne vsebine vseh petih skupin smo nacepili na gojišča za mlečnokislinske bakterije (MRS), za sev *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) (MRS+rif), za koliformne bakterije (Chromocult) ter za sev *E. coli* O157:H7 (Fluorocult).

Vzorce blata smo nacepili tudi na gojišče MRS za laktobacile zato, da bi primerjali delež seva K7 (Rif^r) v blatu s celotno populacijo laktobacilov. Gojišče za skupno število koliformnih bakterij smo uporabili z namenom, da bi ugotovili, ali zaužite celice K7 (Rif^r) vplivajo na rast vseh koliformnih bakterij. Na gojišču Chromocult je namreč mogoče razlikovati koliformne bakterije do drugih (*Enterococcus*, *Citrobacter*, *Salmonela*) na podlagi barve kolonij. Vzorce pa smo nacepili tudi na diferencialno gojišče Fluorocult, ki je specifično za sev O157:H7.

Ker se je izkazalo, da bakterijski sev *E. coli* O157:H7 v prisotnosti drugih bakterij na gojišču Fluorocult ne tvori tipičnih kolonij, selektivno štetje kolonij seva O157:H7 ni bilo mogoče. Zato smo zrasle kolonije s pomočjo fiziološke raztopine sprali s površine plošč ter iz posameznih izpirkov izolirali celokupno bakterijsko DNA, da bi dokazali prisotnost seva *E. coli* O157:H7 z metodo PCR. Značilna sestava, princip delovanja in izgled posameznih gojišč so predstavljeni v preglednici 10.

Število kolonijskih enot bakterij v vzorcih smo ugotavljali z metodo štetja na petrijevih ploščah. Izračunali smo povprečje rezultatov posamezne skupine. Potrditveni test za sev pa smo opravili z metodo PCR.



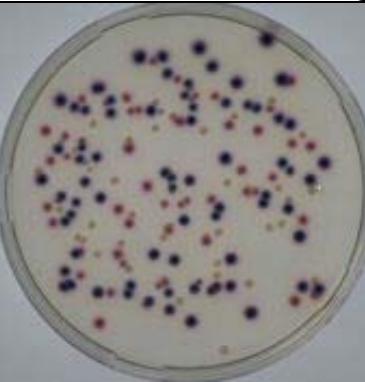
Slika 14: Štetje bakterijskih kolonij na petrijevih ploščah

4.1.1 Izgled kolonij in sestavine gojišč

Preglednica 10: Opis gojišč za laktobacile, koliformne bakterije in *E. coli* O157:H7 (Merck, 2006)

Gojišče	Opis delovanja gojišča
MRS® (De Man, Rogosa in Sharpe) 	<p>Trdno gojišče MRS vsebuje polisorbat, acetat, magnezij in mangan, ki omogočajo selektivno rast laktobacilov. Zrasle kolonije so bele barve in velike do 2 mm.</p> <p>Z dodatkom antibiotika rifampicina smo uspeli osamiti proti rifampicinu rezistentni sev <i>Lactobacillus</i> K7 (Rif), katerega smo namnožili v tekočem gojišču MRS.</p>

Slika 15: *Lactobacillus casei*

Chromocult® Coliform Agar	
	<p>Trdno gojišče združuje dva kromogena substrata, ki omogočata detekcijo skupnega števila koliformnih bakterij in <i>E. coli</i>. Koliformni mikroorganizmi z encimom D-galaktozidazo razgrajujojo substrat galaktopiranozid, kar povzroči obarvanje kolonij oranžno do rdeče barve. <i>E. coli</i> pa z lastnim encimom D-glukuronidazo razgrajuje substrat X-glukuronid in tudi galaktopiranozid, kolonije pa se obarvajo temno modro do vijolične barve.</p>

Slika 16: *E. coli* O157:H7,
E. coli, *Serratia marcescens*

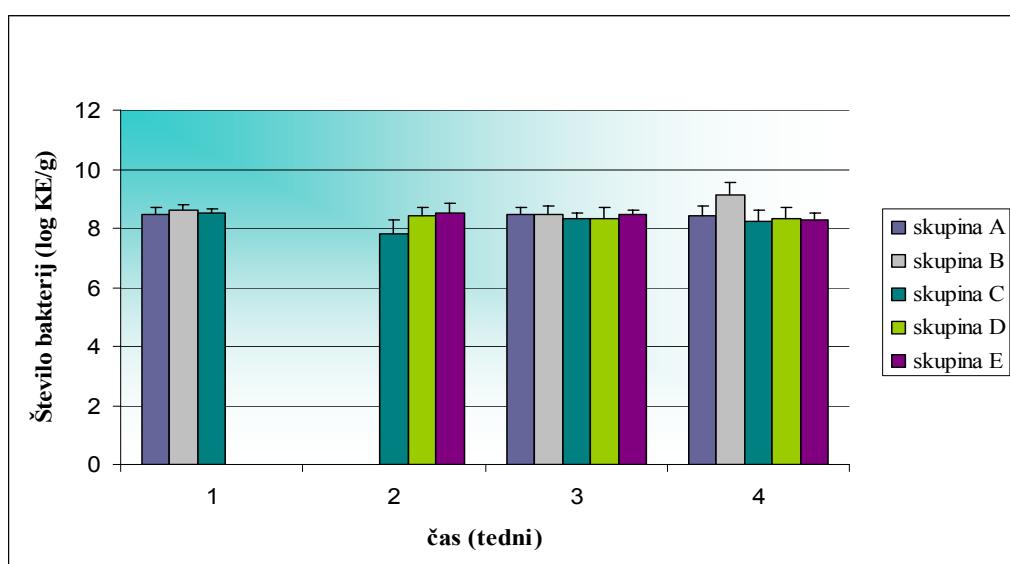
Fluorocult® <i>E. coli</i> O157:H7 Agar	
	<p>Diferencialno gojišče za identifikacijo seva O157:H7 vsebuje natrijev deoksiholat, ki zavre rast vseh po Gramu pozitivnih bakterij. Indikator vrednosti pH bromtimol-modro omogoča oceno razgradnje vsebujočega sorbitola v gojišču, kjer v primeru pozitivne reakcije pride do rumenega obarvanja kolonij. Bakterije, ki ne izkoriščajo sorbitola, ne povzročijo rumenega obarvanja, temveč rastejo v barvi zelenih kolonij, natrijev tiosulfat in železov amonijev citrat pa omogočata rjava-črna razbarvanje medija. Sev O157:H7 se od ostalih sevov <i>E. coli</i> razlikuje po tem, da ne izkorišča sorbitola in ne vsebuje encima glukoronidaze ter po tvorbi brezbarvnih kolonij. Proizvajalec na trdnem gojišču Fluorocult obljudbla zelo dobro rast omenjenega seva.</p>

Slika 17: *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella enteritidis*

4.1.2 Število preiskovanih bakterij v blatu

Slike od 18 do 20 predstavljajo grafičen prikaz rasti (1-4) mlečnokislinskih bakterij, koliformnih bakterij in *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) na posameznih gojiščih, vseh petih skupin (A-E). Grafično so prikazani rezultati povprečij (priloga D1) analiziranih vzorcev blata vsake skupine.

4.1.2.1 Rast bakterij na gojišču MRS



Slika 18: Število bakterij skupin A, B, C, D, E v blatu miši, zraslih na gojišču za laktobacile, 1., 2., 3. in 4. teden poskusnega obdobja

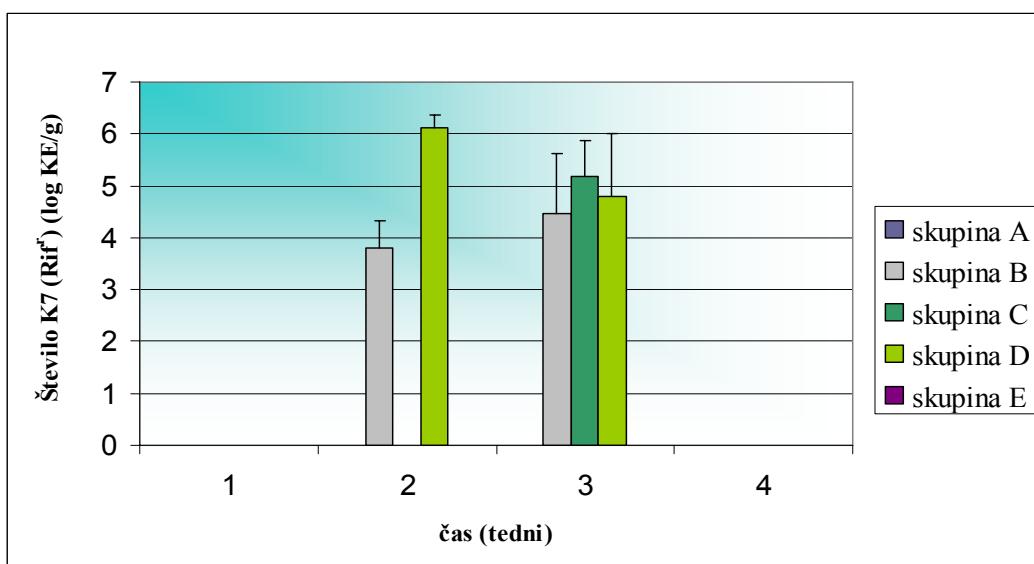
Legenda:

- Skupina A – kontrolna skupina mišk
- Skupina B – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa
- Skupina C – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa
- Skupina D – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa
- Skupina E – enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa

Slika 18 prikazuje rast bakterij iz blata miši v poskusnem obdobju 21 dni, na gojišču za laktobacile MRS. Ker je znano, da na gojišču MRS zrastejo zrastejo tudi številne druge mlečnokislinske bakterije, pa tudi mikroskopiranje naključnih kolonij je to pokazalo, bomo v nadaljevanju govorili o številu mlečnokislinskih bakterij. Povprečno število mlečnokislinskih bakterij skupine A (kontrola) je bilo skozi celotno obdobje okrog $2,5 \times 10^8$ KE/g. Pri skupini B smo ugotovili najvišjo vrednost $1,3 \times 10^9$ KE/g v 4. tednu, kjer je število celic glede na 1. teden naraslo za 0,5 log. Pri skupini C je bilo število največje 1. teden, ko smo ugotovili $3,2 \times 10^8$ KE/g, najmanjše pa 2. teden, ko smo ugotovili $6,3 \times 10^7$ KE/g. Število zraslih celic MKB je bilo pri skupinah D in E približno enako. Največjo variabilnost med vzorci znotraj skupine smo opazili pri skupini B.

Podatkov za število bakterij na gojišču MRS pri skupinah A in B (2. teden) ter D in E (1. teden) nismo uspeli dobiti, saj po inkubaciji na ploščah ni zrasla nobena kolonija.

4.1.2.2 Rast bakterij na gojišču MRS+rif



Slika 19: Število bakterij seva K7 (Rif^r) in nekaterih drugih proti rifampicinu odpornih laktobacilov skupin A, B, C, D, E v blatu miši, zraslih na gojišču MRS+rif, 1., 2., 3. in 4. teden poskusnega obdobja

Legenda:

- Skupina A – kontrolna skupina mišk
- Skupina B – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa
- Skupina C – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa
- Skupina D – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa
- Skupina E – enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa

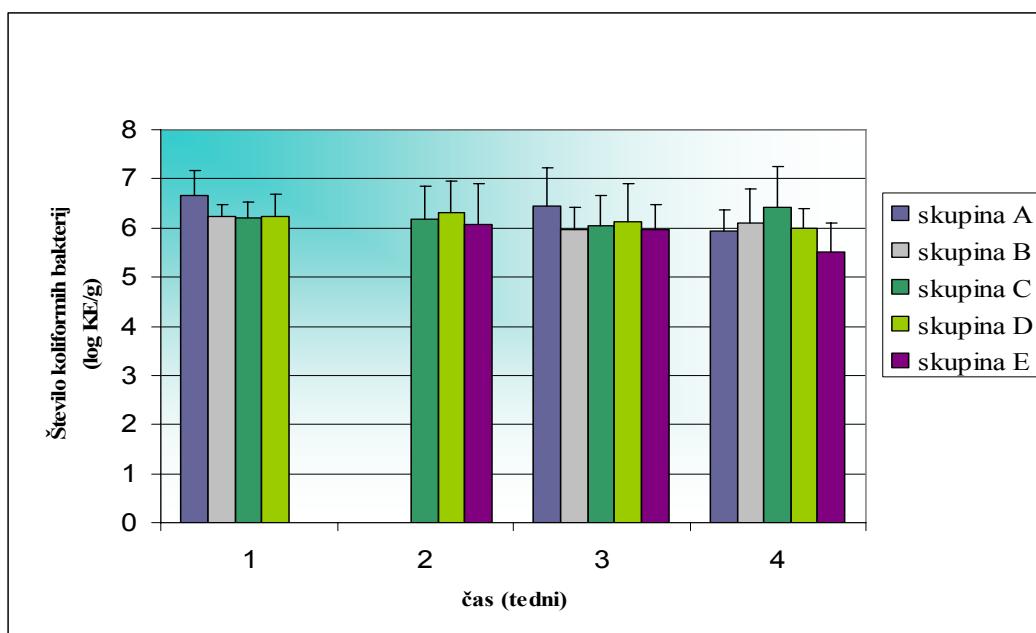
Na sliki 19 je prikazano število proti rifampicinu rezistentnih sevov laktobacilov v blatu miši. Praviloma je na tem gojišču zrasel samo sev K7 (Rif^r), izjemoma pa tudi drugi proti rifampicinu rezistentni sevi, ki jih je v naravi izredno malo. Derivat K7 (Rif^r) smo namreč predhodno pridobili z laboratorijskim precepljanjem prvotnega seva K7 v gojišča z naraščajočo koncentracijo rifampicina. Da bi potrdili specifičnost gojišča, smo naključne kolonije potrdili z analizo RAPD.

Na gojišču MRS+rif smo ugotovili največjo raznolikost v rasti bakterij med posameznimi skupinami. Pri skupini D je bila razlika med številom zraslih KE v 2. in 3. tednu velika 1,3 log, v prid rezultatu v 2. tednu, pri skupini B pa je bilo število v 2. tednu za 0,6 log manjše od tistega v 3. tednu. Povprečno število KE pri skupini C, ugotovljeni v 3. tednu, je znašalo $1,5 \times 10^5$ KE/g (3. teden).

Koeficient variabilnosti je bil najvišji pri podatkih za skupino D.

Rasti ni bilo opaziti pri skupinah A (kontrola) in E skozi celotno poskusno obdobje, kar je pričakovani rezultat, saj nobena od teh dveh skupin ni prejemala celic seva K7 (Rif^r). V 1. in 4. tednu poskusnega obdobja ni bilo rasti pri nobeni od petih skupin.

4.1.2.3 Rast bakterij na gojišču Chromocult



Slika 20: Število koliformnih bakterij skupin A, B, C, D, E, izoliranih iz blata mišk, zraslih na gojišču Chromocult, 1., 2., 3. in 4. teden poskusnega obdobja

Legenda:

- Skupina A – kontrolna skupina mišk
- Skupina B – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa
- Skupina C – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa
- Skupina D – dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa
- Skupina E – enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa

Na sliki 20 je prikazana rast koliformnih bakterij iz blata miši na gojišču Chromocult.

Število koliformnih bakterij na gojišču Chromocult je bilo v primerjavi s številom MKB, zraslih na gojišču MRS, v povprečju nižje za cca. 2,3 log.

Število KE/g blata pri skupini A je znašalo 4×10^6 (1. teden), nakar je med testnim obdobjem upadlo in zadnji teden doseglo vrednost $8,9 \times 10^5$ KE/g. Trend upadanja smo opazili tudi pri skupini E, ki ni prejemala seva K7 (Rif^r). Povprečno število celic pri skupinah B, C in D v 1. tednu je znašalo $1,6 \times 10^6$ KE/g. Pri skupini B in C smo najmanjše število ugotovili v 3. tednu ($9,1 \times 10^5$ KE/g), pri skupini D pa v 4. tednu ($9,5 \times 10^5$ KE/g).

Največje razlike med podatki znotraj skupine smo ugotovili za skupino E.

Števila bakterij na gojišču Chromocult pri skupinah A in B (2. teden) ter E (1. teden), nismo uspeli dobiti, saj na ploščah ni bilo rasti.

4.1.2.4 Rast bakterij na gojišču Fluorocult

Vzorce blata in organov mišk smo nacepili na diferencialno gojišče Fluorocult, po inkubaciji 24 ur pri 37 °C pa smo rast kolonij kvalitativno ovrednotili (priloga B).

Razlikovanje seva *E. coli* O157:H7 od ostalih zraslih sevov na gojišču ni bilo mogoče, zato nismo uspeli pridobili števila kolonij testnega seva. Ker pa uporabljeno gojišče omogoča dobro rast *E. coli* O157:H7, smo se odločili, da bomo njeno prisotnost v vzorcih blata potrdili z reakcijo multiplex PCR na celokupni bakterijski DNA, osamljeni iz suspenzije celic, spranih s plošč.

4.1.3 Prisotnost preiskovanih bakterij v organih

Prisotnost bakterij *E. coli*, zraslih na gojišču Fluorocult, ter rast laktobacilov na gojišču MRS+rif v organih mišk, sta prikazani v prilogah B in C, kjer je predstavljeno število obeh sevov na celotno maso organa.

Z metodo RAPD in reakcijo multiplex PCR smo preverili, če zrasle kolonije v organih in črevesni vsebini pripadajo testnima sevoma K7 (Rif^r) in O157:H7.

4.1.4 Rezultati statistične obdelave podatkov – število preiskovanih bakterij v blatu

Statistične značilnosti smo ugotavljali za bakterijsko rast na gojiščih MRS, MRS+rif in Chromocult, kjer smo opazovali vpliv časa (tedni), vpliv skupine (miši) ter interakcijo med časom in skupino mišk ($\sum_n = 200$).

V preglednicah 11 in 12 so predstavljena števila opazovanj (N), odstopanja od povprečnih vrednosti ($\bar{x} \pm SE$), koeficienti variabilnosti (KV), najvišja (max) vrednost in najnižja vrednost (min) števila zraslih bakterij na posameznih gojiščih (log KE/g).

Ostali statistični parametri so prikazani v prilogah D1 in D2.

V preglednici 11 so prikazani statistični parametri za različne skupine bakterij in 4 vzorčenja.

Preglednica 11: Osnovni statistični parametri števila preiskovanih bakterij v blatu, glede na čas vzorčenja

Gojišče	Čas (tedni)	Statistični parametri				
		N	$\bar{x} \pm SE$ (log KE/g))	KV (%)	min (log KE/g)	max (log KE/g)
MRS	1. teden	25	$8,54 \pm 0,04$	2,27	7,97	8,85
	2. teden	25	$8,33 \pm 0,09$	5,26	7,18	8,99
	3. teden	50	$8,41 \pm 0,04$	3,03	7,63	9,02
	4. teden	49	$8,45 \pm 0,07$	5,57	7,52	9,81
MRS+rif	1. teden	0	/	/	/	/
	2. teden	15	$4,58 \pm 0,31$	26,2	3,23	6,35
	3. teden	21	$4,80 \pm 0,23$	21,9	3,04	6,60
	4. teden	0	/	/	/	/
Chromocult	1. teden	30	$6,33 \pm 0,08$	6,80	5,08	7,41
	2. teden	21	$6,21 \pm 0,15$	10,9	5,15	7,58
	3. teden	39	$6,12 \pm 0,10$	10,2	5,04	7,56
	4. teden	43	$5,98 \pm 0,10$	5,57	4,96	7,37

/ - ni podatka

Največjo variabilnost v rasti (log KE/g) smo opazili na gojišču MRS+rif, in sicer pri skupinah B in D v 2. tednu poskusnega obdobja.

Vpliv časa vzorčenja je statistično značilen ($p < 0,01$) samo za število mikroorganizmov na gojišču Chromocult, skupni vpliv časa in skupine pa je pokazal statistično značilne razlike na rast bakterij ($p = 0,05$) na gojišču MRS ter na rast bakterij na gojišču MRS z rifampicinom ($p = 0,005$).

Spodnja preglednica prikazuje podatke statistične obdelave v odvisnosti od skupine.

Preglednica 12: Osnovni statistični parametri števila preiskovanih bakterij v blatu, glede na vpliv skupine

Gojišče	Skupina	Statistični parametri				
		N	$\bar{x} \pm SE$ (log KE/g)	KV (%)	min (log KE/g)	max (log KE/g)
MRS	A	30	$8,45 \pm 0,05$	3,12	7,85	9,02
	B	29	$8,73 \pm 0,08$	4,70	7,99	9,81
	C	30	$8,24 \pm 0,07$	4,52	7,18	8,76
	D	30	$8,34 \pm 0,06$	4,12	7,52	8,86
	E	30	$8,43 \pm 0,05$	3,04	7,87	8,99
MRS+rif	A	0	/	/	/	/
	B	17	$4,09 \pm 0,21$	21,1	3,04	5,86
	C	6	$5,17 \pm 0,29$	13,7	3,81	5,81
	D	13	$5,31 \pm 0,32$	21,7	3,32	6,60
	E	0	/	/	/	/
Chromocult	A	25	$6,31 \pm 0,13$	9,94	5,11	7,56
	B	23	$6,08 \pm 0,12$	8,32	5,34	7,29
	C	29	$6,22 \pm 0,12$	9,99	5,04	7,37
	D	33	$6,18 \pm 0,10$	8,99	5,08	7,33
	E	23	$5,82 \pm 0,14$	11,5	4,96	7,58

/ - ni podatka

Vpliv skupine je bil statistično značilen ($p < 0,0008$) le za število bakterij na gojišču MRS z rifampicinom, kar sovpada s predhodnimi analizami, saj smo prisotnost celic seva K7 (Rif^r) v blatu z metodo RAPD potrdili pri skupinah B, C in D, ne pa pri skupinah A (kontrola) in E. Med seboj se statistično razlikujeta zlasti skupini B in D ($p = 0,0008$) v drugem tednu poskusnega obdobja, saj razlika med povprečnimi vrednostmi rasti znaša 2,31 log.

4.1.5 Potrditev sevov z metodo PCR

Med poskusom smo z metodo PCR skupno analizirali 504 vzorcev blata, organov in črevesne vsebine.

Od tega je bilo 227 vzorcev analiziranih na prisotnost enterohemoragičnega seva *E. coli* O157:H7 z reakcijo multiplex PCR, pri 277 vzorcih pa smo ugotavljali prisotnost *Lb. gasseri* K7 (Rif^f) z analizo RAPD.

Število analiziranih posameznih vzorcev je prikazano v preglednici 13.

Preglednica 13: Število analiziranih vzorcev blata, organov in črevesne vsebine z metodo PCR

Skupina miši	vzorci blata	vzorci organov	vzorci črevesne vsebine	SKUPAJ
A	12	32	1	45
B	91	27	4	122
C	47	26	45	118
D	113	19	32	164
E	9	16	30	55
SKUPAJ	272	120	112	504

Osamitev DNA s komercialnim kompletom kemikalij Wizard Genomic DNA Purification Kit je bila uspešna. Genomsko DNA izolatov z gojišča MRS+rif smo izolirali iz prečiščenih kultur, ki smo jih nagojili (72 ur pri 37 °C, anaerobno) v tekočem gojišču MRS. Skupno DNA bakterij z gojišča Fluorocult smo izolirali iz suspenzije kolonij. Pomnožke PCR smo analizirali v 1,8 % agaroznem gelu.

4.1.5.1 Reakcija multiplex PCR

Z reakcijo multiplex PCR smo ugotavljali prisotnost enterohemoragičnega seva O157:H7, pri čemer smo uporabili tri sete začetnih oligonukleotidov (Fratamico in sod., 1995). Z njimi smo analizirali 30 vzorcev blata, 107 vzorcev organov in 90 vzorcev črevesne vsebine.

Preglednica 14: Rezultati reakcije multiplex PCR – število pozitivnih rezultatov od števila vseh analiziranih izpirkov *E. coli* iz kolonij, pridobljenih na gojišču Fluorocult iz blata (2. teden poskusnega obdobja) ter iz organov in črevesne vsebine (ob žrtvovanju)

analiza multiplex PCR		+ – število pozitivnih rezultatov za sev O157:H7 št. – število vseh analiziranih izpirkov kolonij z gojišča Fluorocult za posamezno skupino in vzorčenje									
skupina mišk		A		B		C		D		E	
ČAS	VZOREC	+	št.	+	št.	+	št.	+	št.	+	št.
2 . teden	blato	n.p.		n.p.		n.p.		5	30	n.p.	
žrtvovanje	organi	0	27	0	22	0	23	0	19	0	16
	črevesna vsebina	n.p.		n.p.		0	30	0	30	0	30

Legenda: n.p. – ni podatka

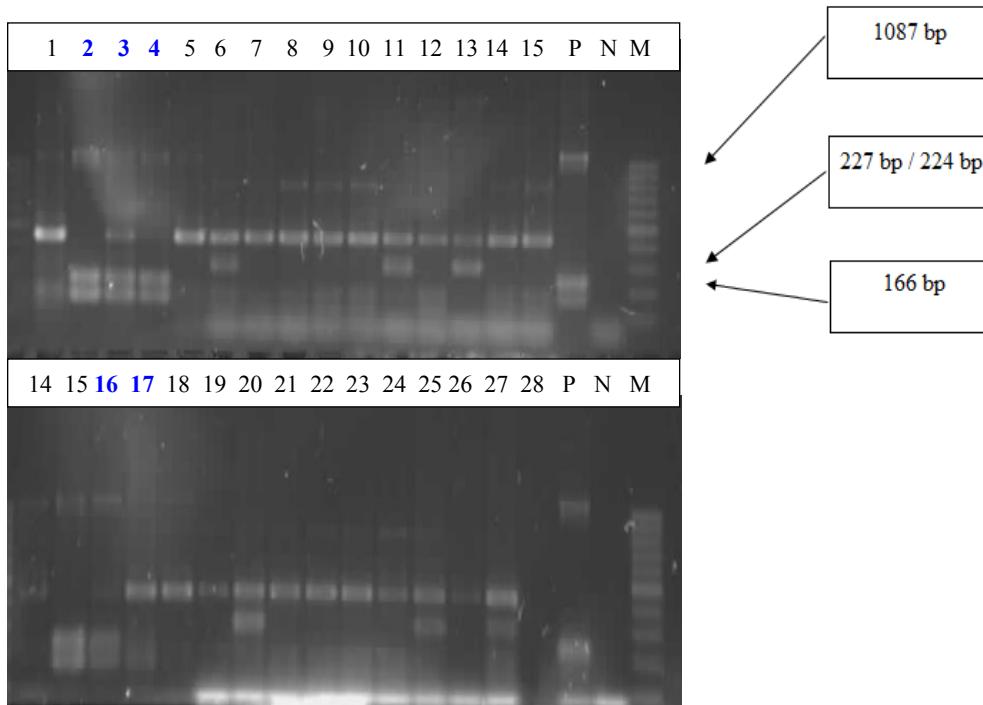
Sev *E. coli* O157:H7 smo v kliničnih vzorcih s pomočjo reakcije multiplex PCR potrdili v 2. in 4. tednu poskusnega obdobja. Pri vzorcih, odvzetih v 3. tednu, PCR nismo mogli izvesti, ker kolonije na gojišču niso zrasle.

Pri miših skupine D smo potrdili sev O157:H7 v 5 vzorcih blata od 30 analiziranih (2. teden). V vzorcih blata skupin A, B, C in E testnega seva nismo mogli potrditi zaradi odsotnosti rasti kolonij na gojišču.

V nobenem od vzorcev organov miši iz vseh petih skupin nismo zasledili seva O157:H7, saj je bil rezultat negativen pri vseh 107 testiranih vzorcih. Prisotnosti testne bakterije nismo ugotovili tudi v nobenem od vzorcev črevesne vsebine skupin miši C in E (60 testiranih).

Kriteriji za potrditev so bili:

- rast na gojišču Fluorocult
- 166 bp velik pomnožek PCR ob uporabi z. o. MS1F in MS1R (odsek DNA na 60 MDa velikem plazmidu)
- 227 bp in/ali 224 bp pomnožek PCR ob uporabi z. o. MK-1 in MK-2 (genski zapis za toksina SLT I in II)
- 1087 bp velik pomnožek PCR ob uporabi z. o. AE-19 in AE-20 (membranski protein).



Slika 21: Pomnožki multiplex PCR, s katerim smo dokazali sev *E. coli* O157:H7. Pomnožke PCR smo ločevali na 1,8 % agaroznem gelu (M-molekularni označevalec 100 bp, P-pozitivna kontrola, N-negativna kontrola). Na progah 2, 3, 4, 16 in 17 so vzorci iz blata mišk skupine D, odvzetih dan po aplikaciji testnega seva, za katere smo potrdili prisotnost seva O157:H7. Ostale lise prikazujejo prisotnost drugih sevov vrste *E. coli*.

Legenda k sliki:

P – referenčni sev *E. coli* O157:H7
N – negativna kontrola (destilirana in avtoklavirana voda)

Na sliki 21 so pomnožki multiplex PCR reakcije, s katero smo določali prisotnost *E. coli* O157:H7 v blatu mišk skupine D (dnevna aplikacija $1,2 \times 10^9$ KE seva K7 (Rif^r) od 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 10^9 KE seva *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa). V petih vzorcih od skupno 30 analiziranih smo potrdili prisotnost seva *E. coli* O157:H7.

4.1.5.2 Analiza RAPD

Z metodo RAPD smo analizirali 242 izolatov iz blata, 13 izolatov iz organov in 22 izolatov iz črevesne vsebine. Rezultati analize so predstavljeni v preglednici 15. Za pomnoževanje smo uporabili začetni oligonukleotid M-13 (Torriani in sod., 1999), s katerim smo potrdili sev *Lb. gasseri* K7 (Rif^r).

Preglednica 15: Rezultati analize RAPD – število izolatov, za katere smo potrdili identičnost s sevom K7 (Rif^r) ter število vseh analiziranih izolatov iz blata, organov in črevesne vsebine miši v 2. in 3. tednu poskusnega obdobja ter ob žrtvovanju

analiza RAPD PCR		+ – število pozitivnih rezultatov za sev K7 (Rif ^r) št. – število vseh analiziranih izolatov v skupini in posameznem vzorčenju									
skupina mišk		A		B		C		D		E	
ČAS	VZOREC	+	št.	+	št.	+	št.	+	št.	+	št.
2. teden	blato	n.p.		50	50	3	3	30	33	0	2
		0	2	35	35	40	41	50	50	0	7
4. teden žrtvovanje	blato	0	10	0	6	0	3	n.p.		n.p.	
	organi	0	5	0	5	0	3	n.p.		n.p.	
	črevesna vsebina	0	1	0	4	5	15	0	2	n.p.	

Legenda: n.p. – ni podatka

Analiza je pokazala negativen rezultat na prisotnost seva K7 (Rif^r) v vseh 18 vzorcih miši skupine A (kontrolna skupina).

Vseh 85 analiziranih izolatov iz blata miši skupine B, odvzetih 2. in 3. teden poskusa, je bilo pozitivnih pri testu RAPD, specifičnem za sev K7 (Rif^r), medtem ko se je za vseh 6 analiziranih izolatov iz vzorcev blata, odvzetih ob žrtvovanju, pokazal negativen rezultat. Negativni so bili tudi rezultati 5 analiziranih izolatov iz organov in 4 izolati iz črevesne vsebine.

Pri skupini C je bilo testiranih 44 izolatov iz blata, odvzetega 2. in 3. teden poskusa. Analiza je pokazala identičnost s sevom K7 (Rif^r) za 3 izolate (2. teden) ter za 40 izolatov (3. teden), medtem ko so 3 testirani izolati iz blata, odvzeti ob žrtvovanju, bili negativni. Prav tako smo identičnost s sevom K7 (Rif^r) potrdili za tretjino od 15 analiziranih izolatov iz črevesne vsebine. Vsi trije analizirani izolati iz organov so se razlikovali od seva K7 (Rif^r).

Vseh 50 testiranih izolatov iz blata mišk skupine D, odvzetih 3. teden poskusa, je bilo pozitivnih. Pozitiven rezultat smo opazili tudi pri 30 izolatih iz blata (2. teden) od skupno 33 testiranih. Negativna pa sta bila rezultata obeh 2 analiziranih vzorcev črevesne vsebine.

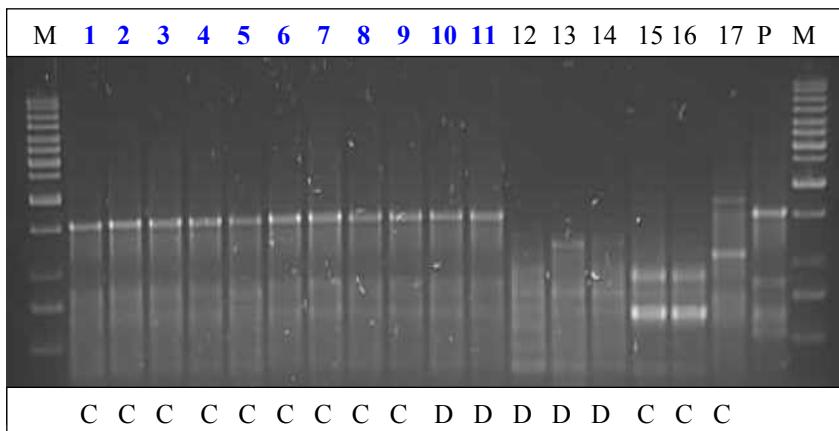
Kot pričakovano, nobena od 9 kolonij, ki smo jih izolirali iz blata, odvzetega v 2. in 3. tednu, ni bila po vzorcu RAPD identična s sevom K7 (Rif^r), saj miši iz te skupine niso prejeli seva K7 (Rif^r), ampak samo celice *E. coli*.

Pri skupinah miši A, D in E pri nekaterih vzorčenjih na ploščah nismo zasledili kolonij, zato potrditev z RAPD ni bila mogoča.

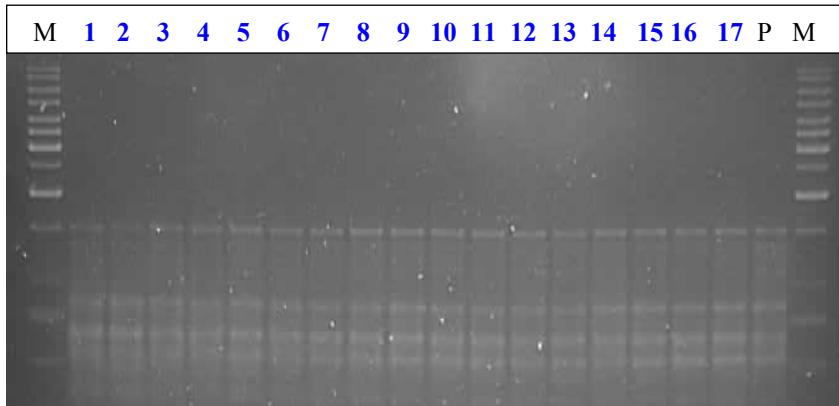
Kriteriji za potrditev so bili:

- rast na gojišču MRS+rif
- vzorec RAPD, specifičen za sev K7 (Rif^r), ob uporabi začetnega oligonukleotida M-13.

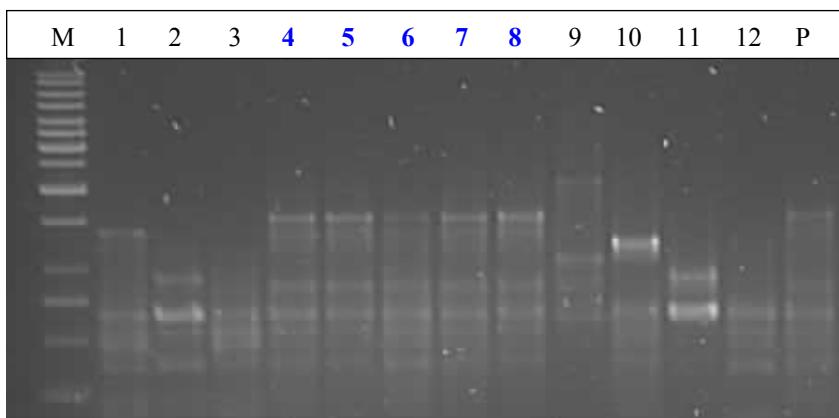
Pri pregledu rezultatov analize RAPD smo ugotovili, da je vzorec (lise podobnih velikosti), značilen za sev K7 (Rif^r), močno prevladoval, saj je 209 od 223 laktobacilov, izoliranih iz blata (2. in 3. teden) pripadalo temu genotipu (so imeli isti vzorec RAPD). Ostali sevi, ki se niso ujemali s tem genotipom, predstavljajo druge seve laktobacilov, ki so odporni proti rifampicinu.



Slika 22: Pomnožki RAPD z z. o. M-13. Pomnožke PCR smo ločevali na 1,8 % agaroznem gelu (M-molekularni označevalec 1000 bp, P-pozitivna kontrola). Na progah 1-14 so izolati iz blata, na progah 15-17 pa izolati iz organov. Na sliki je razvidno, da en vzorec močno prevladuje (proge 1-11). Vzorci na progah 12-17 pa se od ostalih močno razlikujejo. Na sliki so rezultati analize izolatov iz miši pri skupinah C (3. teden) in D (2. teden).



Slika 23: Pomnožki RAPD z z. o. M-13, ki dokazujejo prisotnost K7 (Rif^r) v blatu. Proge 1-17 predstavljajo izolate iz blata miši skupine B v 2. tednu poskusnega obdobja. Vsi vzorci na sliki so identični s testnim sevom K7 (Rif^r), saj se je pri RAPD pokazal isti vzorec pomnožkov.



Slika 24: Pomnožki RAPD z z. o. M-13, s katerim smo dokazali sev K7 (Rif^r) v črevesni vsebini. Proge 1-12 predstavljajo izolate iz črevesne vsebine miši. Na sliki je razvidno, da en vzorec močno prevladuje (proge 4-8). Vzorci na ostalih progah pa se od teh močno razlikujejo. Slika kaže na prisotnost testnega seva K7 (Rif^r) v slepem črevesu miši skupine C ob žrtvovanju.

Legenda k slikama:

M – molekularni označevalec velikosti 1000 bp
P – referenčni sev *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif^r)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV O ŠTEVILU BAKTERIJ V BLATU

V modelu, s katerim smo obdelali statistične značilnosti različnih vplivov na rast bakterij, izoliranih iz blata, smo izpostavili tri vplive, in sicer vpliv časa, vpliv skupine ter njun skupni vpliv.

Za število bakterij, zraslih na gojišču MRS (število opazovanj = 149) smo ugotovili, da je uporabljen model statistično značilen ($p < 0,0001$). Vendar ker delež celotne pojasnjene variabilnosti znaša zgolj 25 %, lahko sklepamo, da so poleg vpliva časa in tretiranja (skupine miši), na število bakterij vplivali tudi drugi dejavniki. Med možnimi vplivi bi lahko bili poškodbe bakterijskih celic med zamrzovanjem, čas shranjevanja vzorcev pred analizo, ali nihanja v sestavi gojišč, pa tudi veliko variabilnost naravno prisotne mikroflore posameznih živali.

Za število bakterij, zraslih na gojišču Chromocult za koliformne bakterije (število opazovanj = 133), smo ugotovili, da je model statistično značilen ($p = 0,02$), delež pojasnjene variabilnosti pa je znašal 15 %, kar prav tako kaže na to, da so na rezultate vplivali razen časa vzorčenja in tretiranja tudi drugi dejavniki.

Nizek odstotek pojasnjene variabilnosti pri bakterijah, zraslih na gojiščih MRS in Chromocult lahko pojasnimo z dejstvom, da obe gojišči nista zelo selektivni in omogočata rast razmeroma pestri bakterijski populaciji mlečnokislinskih bakterij (MRS) ter koliformnih bakterij (Chromocult), zato zaužite testne bakterije sevov K7(Rif) in *E. coli* O157:H7 niso značilno vplivale na rezultate štetja. Neznačilen vpliv je mogoče razložiti tudi z razmeroma majhnim številom zaužitih bakterij obeh sevov glede na vse bakterije, ki se nahajajo v prebavilih in so sposobne zrasti na gojiščih MRS in Chromocult, ter velike razlike v naravno prisotni mikroflori med živalmi.

Model je pokazal statistično značilnost ($p = 0,0006$) za rast laktobacilov na gojišču MRS z rifampicinom, kjer znaša delež pojasnjene variabilnosti 46 %.

Zaradi majhnega števila bakterij na gojišču MRS z rifampicinom oziroma relativno velikega števila vzorcev, pri katerih kolonij nismo ugotovili, je bilo te ponekod (skupina miši A in E, prvi in zadnji teden poskusa) nemogoče statistično ovrednotiti, saj je bilo število opazovanj le 36, zato rezultati, ki opišejo statistično značilnost modela za bakterijsko rast na gojišču MRS+rif, niso zanesljivi.

5.2 ŠTEVILLO BAKTERIJ V BLATU

Koncentracijo bakterij v blatu smo določali na različnih gojiščih.

5.2.1 Gojišče MRS z rifampicinom

Prisotnost seva *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) smo ugotavljali na trdnem gojišču MRS, ki smo mu dodali antibiotik rifampicin. Inkubacija je potekala anaerobno 72 ur pri 37 °C. Gojišče MRS omogoča rast laktobacilom, vendar pa na njem rastejo tudi druge mlečnokislinske bakterije. Rifampicin pa v uporabljeni koncentraciji (120 µg/mL) zavira veliko večino naravnih mlečnokislinskih bakterij, ki sicer tudi lahko zrasejo na gojišču MRS.

V 1 g mišjega blata smo na gojišču MRS+rif ugotovili od $6,5 \times 10^3$ KE (skupina B) do $1,3 \times 10^6$ KE seva K7 (Rif^r) (skupina D). Delež proti rifampicinu odpornih laktobacilov na gojišču MRS+rif je predstavljal manj kot 1% celotne mikrobine populacije mlečnokislinskih bakterij, zraslih na gojišču MRS.

Naši rezultati so primerljivi z rezultati Bogovič Matijašić in sod. (2006 b), kjer je *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) preživel prehod skozi GIT odstavljenih prašičkov. V blatu so ga ugotovili v koncentracijah, ki so bile za približno 3 log nižje od koncentracij vseh laktobacilov v blatu.

5.2.2 Gojišči MRS in Chromocult

Vzorce blata smo nacepili tudi na gojišča za skupno število koliformnih bakterij in laktobacilov oziroma mlečnokislinskih bakterij z namenom, da bi ugotovili ali zaužite celice sevov K7 (Rif^r) in O157:H7 vplivajo na njihovo število.

Koncentracijo laktobacilov oziroma mlečnokislinskih bakterij v blatu miši smo ugotavljali s štetjem kolonij, ki so zrasle pri anaerobnem gojenju na trdnem gojišču MRS. Število zraslih kolonij se je gibalo med $6,3 \times 10^7$ in $1,3 \times 10^9$ KE/g.

Aplikacija probiotičnega seva K7 (Rif^r) ($1,2 \times 10^9$ KE/dan) in enterohemoragičnega seva O157:H7 (1×10^9 KE) tako v poskusnem obdobju, kot po prenehanju aplikacije omenjenih sevov, nista značilno vplivala na rast mlečnokislinskih bakterij ($p < 0,05$), saj med rezultati za kontrolno skupino ter testne skupine ni bilo značilnih razlik. Vse obdobje poskusa smo največje razlike v rasti med skupinami opazili 4. teden, vendar tudi te niso bile statistično značilne.

Zaradi kompleksne sestave črevesne mikroflore, zaužiti sevi laktobacilov ponavadi nimajo vpliva na skupno število laktobacilov (Shu in Gill, 2001).

Prisotnost koliformnih bakterij smo ugotovljali na trdnem gojišču Chromocult, po aerobni inkubaciji 24 ur pri 37 °C. Ugotovili smo, da je v blatu miši koncentracija mlečnokislinskih bakterij cca. 200x večja v primerjavi s koncentracijo koliformnih bakterij, saj se vrednosti gibljejo med $3,2 \times 10^5$ in $4,6 \times 10^6$ KE/g.

Statistično značilno je na rast koliformnih bakterij vplival čas vzorčenja ($p < 0,05$), kjer smo največjo variabilnost v rasti zasledili v 2. tednu. Aplikacija testnih sevov O157:H7 in K7 (Rif^r) ni značilno vplivala na rast koliformnih bakterij v blatu.

Podobno so Bogovič Matijašič in sod. (2004; 2006 b) so ugotovili, da uživanje sevov *Lb. gasseri* K7 (Rif^r), *Lb. gasseri* K7 ali *Lb. gasseri* LF221 ni značilno vplivalo na skupno število koliformnih bakterij v vzorcih blata odstavljenih prašičkov.

5.2.3 Gojišče Fluorocult

Prisotnost bakterij seva *E. coli* O157:H7 na gojišču Fluorocult, smo ocenili le kvalitativno (Priloga B), ker štetje ni bilo mogoče. Ker smo opazili, da bakterijski sev *E. coli* O157:H7 v prisotnosti drugih bakterij vrste *E. coli* na gojišču Fluorocult ne tvori tipičnih kolonij, smo sev skušali dokazati z metodo PCR na bakterijski DNA, izolirani iz mešanice vseh kolonij (izpirkov) z gojišča.

Heizmann in sod. (1988) navajajo, da gojišče Fluorocult ni primerno za rutinsko testiranje prisotnosti bakterijskih vrst *E. coli* v blatu, temveč bolje služi pri epidemioloških raziskavah detekcije enterohemoragičnih serotipov *E. coli*. V nasprotju z ostalimi bakterijskimi sevi *E. coli*, sev O157:H7 ne izkorišča sorbitola, zato ni bilo rumenega obarvanja zraslih kolonij. Poleg tega ne formira encima glukuronidaze, kar pomeni, da kolonije pri presvetlevanju z UV-svetlobo ne flurescirajo.

Za osamitev bakterijskega seva *E. coli* O157:H7, bi lahko uporabili tudi trdno gojišče MacConkey s sorbitolom, kot so to storili v predhodnih raziskavah (Al-Ajmi in sod., 2005; Blatnik in sod., 2002; Johnson in sod., 2008; Sušić in Tomić Paradžik, 2009), kjer so uspeli razlikovati iskani sev med ostalo floro. MacConkey agar vsebuje kalijev telurit, kar bi morda v našem primeru pripomoglo k večji selektivnosti in lažji določitvi testnega seva na ploščah po inkubaciji.

5.3 POTRJEVANJE TESTNIH SEVOV S PCR

V okviru naloge smo analizirali bakterije iz vzorcev blata, odvzetih 8. in 15. dan poskusa ter ob žrtvovanju miši, ko so bili mišim odvzeti tudi organi. Želeli smo ugotoviti, ali testna seva K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 po zaužitju preživita prehod skozi GIT ter kakšna je njuna medsebojna interakcija. Poleg tega smo prisotnost celic obeh sevov ugotovljali tudi v črevesju ter v parenhimskih organih, da bi ugotovili njuno morebitno translokacijo.

5.3.1 Potrditev *E. coli* O157:H7

Prisotnost kultivabilnih celic *E. coli* O157:H7 v blatu in organih mišk smo ugotavljali z reakcijo multiplex PCR. Tarčno DNA smo izolirali iz kolonij, zraslih po nacepljanju vzorcev blata na gojišče Chromocult. Uporabili smo tri sete začetnih oligonukleotidov, kjer MS1F in MS1R pomnožujeta odsek DNA na 60 MDa velikem plazmidu, MK-1 in MK-2 pomnožujeta gene za virulenčne dejavnike (toksini) ter AE 19 in AE 20 pomnožujeta zapis gena *eaeA* za membranski protein intimin_{O157:H7} (Fratamico in sod., 1995).

Pomnožki PCR, specifični za sev O157:H7 so veliki 166 bp (plazmid), 224 ali/in 227 bp (SLT) ter 1087 bp (membranski protein).

Prisotnost živih bakterij seva O157:H7 smo potrdili v blatu miši skupine D, ki je v poskusnem obdobju 2. tedna prejemala dnevni odmerek seva K7 (Rif^r) ter enkratno dozo EHEC (8. dan). *E. coli* O157:H7 je bila prisotna samo v vzorcih blata, odvzetih prvi dan po aplikaciji omenjenega seva, drugi in tretji dan po aplikaciji pa prisotnosti nismo več opazili. Prisotnost seva O157:H7 smo dokazali pri 5 miših od 10 analiziranih (skupina D). V organih in črevesni vsebini miši seva O157:H7 nismo uspeli potrditi pri nobeni od skupin (preglednica 14).

Rezultati prisotnosti seva O157:H7 v blatu so pokazali, da EHEC preživi prehod skozi GIT, saj so celice, izolirane iz blata bile kultivabilne in smo jih uspeli vzgojiti. O številu zraslih bakterij ne moremo govoriti, saj smo rast vrste *E. coli* na gojišču Fluorocult dokazali le kvalitativno.

Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da se EHEC ni uspela pripeti in kolonizirati črevesne sluznice. Nasprotno so v poskusu na miših dokazali Nagano in sod. (2003) ter Johnson in sod. (2008), kjer so ugotovili, da se EHEC uspešno pripne na epitelne celice ter kolonizira črevesno sluznico, kjer akumulira F-aktin. Pri tem pa histopatoloških sprememb, črevesnih krvavitev in driske, z mikroskopskim pregledom tkiva niso opazili.

V našem primeru o invazivnosti EHEC ne moremo govoriti, saj celic O157:H7 tudi v ostalih organih (želodec, jetra, ledvice, vranica, bezgavke) nismo potrdili. Že pri štetju kolonij na trdnem gojišču Fluorocult smo ugotovili, da gojišče ni dovolj diferencialno, saj ne omogoča tipičnega razlikovanja med sevom O157:H7 in ostalimi sevi *E. coli*. Zato predvidevamo, da se v organih nahajajo nevirulentni sevi *E. coli*, ki predstavljajo del normalne mikrobne združbe GIT.

Za ločevanje pomnožkov reakcije multiplex smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo, medtem, ko so Fratamico in sod. (1995) uporabili metodo hibridizacije Southern, kjer so uporabili sondu, označeno na 3'-koncu nukleotidnega zaporedja. Avtorji poudarjajo, da je multiplex PCR za specifično detekcijo EHEC O157:H7 zanesljiva le takrat, ko gene za virulenco (SLT I, II in gen *EaeA*) ter plazmid, velik 60 MDa, pomnožujemo hkrati.

5.3.2 Potrditev *Lb. gasseri* K7 (Rif^r)

V poskusu smo uporabili proti rifampicinu odporen sev *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif^r), ki so ga Perko in sod. (2002) pridobili s precepljanjem celic K7 v tekočem gojišču MRS z naraščajočo koncentracijo rifampicina (do končne koncentracije 120 µg/mL). Uspešno uporabo derivatov probiotičnih bakterij odpornih proti rifampicinu, pri proučevanju preživelosti probiotičnih bakterij v različnih mikrobnih združbah ali možnosti njihovega vključevanja v sir, navajajo tudi Gardiner in sod. (1999) ter Perko in sod. (2002).

Probiotični sev *Lb. gasseri* K7 (Rif^r), smo v mišjem blatu in organih ugotavljeni z metodo RAPD, ki omogoča razlikovanje med sevi iste vrste. Tarčno DNA smo pridobili iz posameznih kolonij, ki so zrasle na gojišču za laktobacile, ter smo jih pred izolacijo namnožili v gojišču MRS. Za pomnoževanje smo uporabili začetni oligonukleotid M-13 (Torriani in sod., 1999), rezultate pa smo primerjali z vzorcem pomnožkov RAPD, tipičnim za sev K7 (Rif^r).

Žive bakterije seva K7 (Rif^r) so bile v blatu prisotne 8. in 15. dan poskusa pri vseh treh skupinah, ki so prejemale dnevni odmerek laktobacila (skupine B, C, D) z izjemo miši skupine D1 (1., 2. in 4. miš) v 2. tednu ter miši skupine C2 (2. miš) v 3. tednu poskusnega obdobja (preglednica 15). V sestavi normalne mikrobne združbe gastrointestinalnega trakta lahko obstajajo velike razlike med živalmi znotraj iste skupine, zato v nekaterih vzorcih blata nismo uspeli potrditi prisotnosti omenjenega probiotika. Podobno so ugotovili Gardiner in sod. (2004) pri poskusu na prašičih. Avtorji navajajo, da je učinek in stopnja preživetja zaužitih probiotičnih sevov odvisna od posameznega gostitelja, kjer samo povprečno število ugotovljenih bakterij ne pove veliko.

V skladu z našimi ugotovitvami, so Bogovič Matijašić in sod. (2004) ter Stojković (2003) dokazali, da *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) preživi prehod skozi gastrointestinalni trakt in vsaj začasno naseli intestinalno sluznico konvencionalnih in gnotobičnih prašičkov.

Prisotnost seva K7 (Rif^r) v blatu smo ugotavljeni tudi po prenehanju hranjenja miši s tovrstnim laktobacilom, da bi ocenili njegovo pripenjanje na črevesno sluznico miši. Probiotičnega seva 7 dni po prenehanju aplikacije nismo uspeli dokazati v blatu pri nobeni skupini (19 analiziranih vzorcev skupine miši B in C).

Gardiner in sod. (2004) so dokazali prisotnost nekaterih sevov laktobacilov v blatu prašičkov tudi pet dni po prenehanju aplikacije, Bogovič Matijašić in sod. (2006 b) pa so poročali o prisotnosti sevov LF221 in K7 v blatu in črevesni vsebinai prašičkov tudi šest dni po prenehanju aplikacije.

Avtorji navajajo, da je za vzdrževanje probiotikov v blatu v višjih koncentracijah potrebno kontinuirno uživanje omenjenih bakterij. Koncentracija zaužitih sevov sicer odseva njihovo preživetje v črevesju, ni pa zanesljiva pri ugotavljanju naseljevanja in pripenjanja probiotičnih bakterij. Zato je kapacitet vezave apliciranih sevov potrebno preizkusiti na črevesni sluznici *in situ*.

V črevesju in drugih organih (skupina B in C) nismo uspeli dokazati prisotnosti zaužite probiotične bakterije (analiziranih 13 vzorcev). Zato hipoteze o pripenjanju K7 (Rif^r) ne moremo niti potrditi niti zavreči, saj bi bilo za oblikovanje tega sklepa potrebno opraviti več nadalnjih preiskav, kot na primer pregled črevesnih epitelnih celic s pomočjo elektronske mikroskopije. Domnevamo lahko, da se sev K7 (Rif^r) ni uspešno pripel na intestinalno sluznico in je lahko zapustil GIT miši kmalu po prenehanju aplikacije, lahko pa je bila koncentracija pripetih celic prenizka za detekcijo. Ker na pripenjanje vplivajo tudi pogoji *in vitro* (vrednost pH, in koncentracija suspenzije celic), bi bilo potrebno opazovati tudi te.

Bogovič Matijašić in sod. (2003), so ugotovili, da je pri raziskovanju kolonizacijskih sposobnosti probiotikov zelo pomembno testiranje njihovega pripenjanja na črevesno sluznico.

Orel (2001) navaja, da je dnevni odmerek probiotičnih bakterij, ki zadošča za poselitev humanega črevesja, $6,5 \times 10^9$ celic, ki jih najpogosteje zaužijemo v enkratnem odmerku. Odmerek, uporabljen v predstavljeni raziskavi, je bil $1,2 \times 10^9$ KE za žival dnevno, kar bi glede na težo miši precej preseglo običajne dnevne odmerke za ljudi.

V predhodnih raziskavah na celičnih modelih *in vitro* so ugotovili, da obstaja neposredna korelacija med številom zaužitih probiotičnih bakterij ter številom na epitelne celice pripetih le-teh (Bogovič Matijašić in sod., 2003; Lee in sod., 2000; Tuomola in Salminem, 1998), medtem ko je *in vivo* takšno povezavo težko potrditi.

Sposobnost pritrjevanja probiotičnih bakterij na črevesne epitelijske celice je eden osnovnih kriterijev pri izbiri potencialnega probiotičnega seva. Ta sposobnost sevu omogoča, da se zadrži v prebavilih dalj časa, s tem pa se podaljša trajanje njegovih ugodnih učinkov (Rogelj in Bogovič Matijašić, 2006).

Zanimivo je, da smo celice zaužitega seva K7 (Rif^r) zasledili v vsebini slepega črevesja pri miši skupine C2 (2. miš), medtem ko jih pri isti miši v blatu (15. dan) nismo zasledili. Bakterija se je očitno zadrževala v črevesu še 8 dni po prenehanju aplikacije.

Zaključkov o tem, ali je probiotični sev K7 (Rif^r) pri miših, ki so poleg omenjenega prejemale tudi *E. coli* O157:H7, na kakršenkoli način vplival na manjšo adhezijo patogene bakterije na črevesni sluznici ter na ta način zmanjšal resnost okužbe z enterohemoragično bakterijo, samo na podlagi naših rezultatov ne moramo podati. Nadalje bi bilo potrebno opraviti podrobnejše preiskave, ki vključujejo pregled histo-patoloških in imuno-histoloških rezin črevesa s pomočjo transmisivskega elektronskega mikroskopa, ugotavljanje anti- *E. coli* IgA v vzorcih blata (ELISA) ali študije genske ekspresije.

Rezultati raziskave avtorjev Shu in Gill (2002), na mišjem modelu so pokazali, da periodično uživanje seva *Lb. rhamnosus* HN001 zmanjša resnost okužbe z *E. coli* O157:H7. Pri miših, ki so poleg *E. coli* dobivale celice seva HN001 so ugotovili tudi manj primerov translokacije EHEC v parenhimske organe.

Sherman in sod. (2005) ter Johnson in sod. (2008) navajajo, da število bakterijskih celic v blatu ne odseva realnih rezultatov o njihovem pripenjanju, namnoževanju in zaviranju drugih bakterij.

Rogelj in Bogovič Matijašić. (2006) sta ugotovili, da so laktobacili učinkoviti pri zmanjšanju adhezije *E. coli* na enterocite Caco-2 modela *in vitro*, ne pa na sluznici tankega črevesa prašičkov *ex vivo*. V poskusu se je *E. coli* na celice Caco-2 pripela bolje kot probiotični sev K7 (Rif^r), vendar je slednji uspel zmanjšal vezavo patogene bakterije v poskusih izključevanja in kompeticije.

Avtorji poudarjajo, da bi bilo za pridobitev podatkov o zanesljivosti zaščitnih učinkov mlečnokislinskih bakterij pri okužbi z EHEC *in vivo*, potrebno opraviti več tovrstnih raziskav (Shu in Gill, 2002).

5.4 SKLEPI

- Gojišče Fluorocult ni dovolj diferencialno, da bi omogočilo razlikovanje tipičnih kolonij *E. coli* O157:H7 od drugih sevov vrste *E. coli*, saj morfologija kolonij ni bila dobro prepoznavna.
- Z metodo RAPD in multiplex PCR smo uspešno zasledili seva *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*) in *E. coli* O157:H7 na gojiščih, na katera smo nacepili vzorce blata miši, zato sta metodi primerni za potrjevanje omenjenih bakterijskih sevov v mešani bakterijski populaciji.
- *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*) in *E. coli* O157:H7 sta preživela prehod skozi GIT miši, saj smo prisotnost obeh sevov potrdili v blatu s pomočjo metode RAPD in multiplex PCR, potem ko je bila tarčna DNA pridobljena iz posameznih izolatov (RAPD) oziroma mešanice kolonij (multiplex PCR).
- V organih nismo našli nobenega od testnih sevov, kar nakazuje, da se *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*) in *E. coli* O157:H7 ne translocirata v parenhimske organe testnih miši.
- V vsebini slepega črevesja smo dokazali prisotnost K7 (*Rif^r*) samo pri miši iz skupine C, ki so dnevno prejemale od 8. do 21. dneva *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*), enkratni odmerek *E. coli* O157:H7 pa so prejele 8. dan.
- *Lb. gasseri* K7 (*Rif^r*) je v blatu miši zastopan v manj kot 1 % deležu celotne mikrobnje populacije mlečnokislinskih bakterij, njegova koncentracija pa se je gibala med $6,5 \times 10^3$ do $1,3 \times 10^6$ KE/g.
- Aplikacija seva K7 (*Rif^r*) in O157:H7, tako v poskusnem obdobju kot po prenehanju aplikacije, ni vplivala na število koliformnih in mlečnokislinskih bakterij.
- Z uporabljenimi metodami nismo uspeli ugotoviti pripenjanja sevov K7 (*Rif^r*) in O157:H7 na črevesno sluznico.

6 POVZETEK

Sev *Lactobacillus gasseri* K7 je humani izolat, odporen proti nizkim vrednostim pH in žolču, ki proizvaja bakteriocine s širokim spektrom protimikrobnne aktivnosti, preživi prehod skozi črevesje miši in pujskov, spada v skupino GRAS bakterij in kot tak izpolnjuje osnovne kriterije za probiotik.

Virulentni sevi vrste *Escherichia coli* povzročajo različne infekcijske bolezni, med najbolj patogene spada enterohemoragična *E. coli*, serotip O157:H7, ki je bila leta 1982 prvič opisana kot povzročiteljica krvave driske pri človeku. *E. coli* O157:H7 povzroča hemoragični kolitis in je povezana z resnimi zapleti, kot je hemolitični sindrom.

V naši nalogi smo raziskovali primernost klasičnih mikrobioloških in molekularnih metod za spremljanje sevov *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 v vzorcih blata, črevesne vsebine in organov miši. Poleg tega smo žeeli ugotoviti, ali je probiotični sev K7 (Rif^r) sposoben omiliti ali celo preprečiti okužbo z *E. coli*. Razen omenjenega funkcionalnega učinka smo pridobili tudi podatke o morebitni translokaciji preskušanega probiotičnega seva v organe testnih miši, kar je pomembno s stališča varnosti.

Vzorce blata in organov smo dobili od 50 miši, ki so bile vključene v 28 dni trajajoč poskus. Poskus je bil razdeljen na obdobje prilagajanja (7 dni) ter na poskusno obdobje (21 dni).

Miši so bile razdeljene v 5 skupin, kjer je bila skupina A kontrolna. Miši iz skupin B, C in D so od 8. do 21. dne dnevno prejemale po $1,2 \times 10^9$ KE probiotika *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif^r), miši iz skupine C so poleg probiotika prejele 8. dan tudi enkratni odmerek *E. coli* O157:H7, miši iz skupine D so poleg probiotika s 7-dnevnim zamikom prejeli enkratni odmerek *E. coli* O157:H7, miši iz skupine E pa so prejele samo sev O157:H7, in to 8. dan.

Vzorce blata, organov in črevesne vsebine smo nacepljali na gojišča Chromocult (za koliformne bakterije), Fluorocult (za *E. coli* O157:H7), MRS (za laktobacile) in MRS+rif (za sev K7 (Rif^r)). Posamezne izolate proti rifampicinu odpornih laktobacilov smo potrdili na nivoju seva z metodo RAPD, v mešanici kolonij z gojišča Fluorocult za *E. coli* pa smo s pomočjo reakcije multiplex PCR dokazovali prisotnost enterohemoragičnega seva O157:H7.

Pri gojenju bakterij *E. coli* smo naleteli na težavo. Gojišče Fluorocult, ki smo ga uporabili za selektivno gojenje seva O157:H7, ni dalo pričakovanih rezultatov, kot jih oblikuje proizvajalec. Zato na ploščah nismo mogli ločevati kolonij zaužitih bakterij seva O157:H7 od ostalih kolonij, ki so zrasle na tem gojišču, saj v mešani kulturi dodane bakterije niso tvorile značilnih kolonij. Zato podatka o številu bakterij EHEC v posameznih vzorcih nismo dobili.

Dobili smo sledeče rezultate: na gojišču za MRS, ki je sicer namenjeno za laktobacile, pa so razen laktobacilov na njem zrasli tudi drugi predstavniki mlečnikislinskih bakterij, je zraslo od $6,3 \times 10^7$ do $1,3 \times 10^9$ KE/g blata, na trdnem gojišču za koliformne bakterije pa smo ugotovili od $3,2 \times 10^5$ do $4,6 \times 10^6$ KE/g blata.

Na gojišču MRS+rif, ki je bilo kar dobro selektivno za K7 (Rif^r), saj so se le redke z RAPD pregledane kolonije razlikovale od seva K7 (Rif^r), je rast variirala med $6,5 \times 10^3$ KE in $1,3 \times 10^6$ KE v g blata. Rast bakterij za seva O157:H7 na gojišču Fluorocult, smo zaradi opisanih težav ovrednotili le kvalitativno.

Z metodo RAPD smo analizirali DNA, pridobljeno iz izolatov proti rifampicinu odpornih laktobacilov, zraslih na gojišču MRS+rif. Na ta način smo potrdili selektivnost gojišča in prisotnost kultivabilnih bakterij seva *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) v blatu vse obdobje aplikacije probiotika. 208 izolatov od 212 analiziranih iz obdobja aplikacije probiotika je bilo identičnih sevu K7 (Rif^r). 7 dni po prenehanju aplikacije prisotnosti seva K7 (Rif^r) nismo več zasledili (0 pozitivnih izolatov od 9 analiziranih). V organih seva K7 (Rif^r) nismo uspeli dokazati (0 pozitivnih od 8 analiziranih), pri miših skupine C pa smo njegovo prisotnost potrdili v vsebini slepega črevesa.

Z reakcijo multiplex PCR smo s pomočjo treh setov začetnih oligonukleotidov potrdili prisotnost *E. coli* O157:H7 v mešanici kolonij, ki so bile pridobljene iz vzorca blata pri 5 miših od 10 analiziranih (skupina D) le prvi dan po aplikaciji, kasneje bakterij tega seva nismo več zasledili. Pri skupinah miši, ki so prejele *E. coli* O157:H7, teh bakterij nismo zasledili v organih (0 pozitivnih od 58 analiziranih), niti v črevesni vsebini (0 pozitivnih od 90 analiziranih).

Na podlagi rezultatov opravljenih analiz nismo uspeli ugotoviti, ali sta se *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 pripela na črevesno sluznico miši. Prav tako nismo ugotovili njune translokacije v parenhimske organe. Sposobnost pritrditve v črevesju je pomembna, ker se tak probiotični sev zadrži v prebavilih dalj časa, kar podaljša trajanje njegovega učinkovanja. Na sposobnost pritrjevanja vpliva veliko dejavnikov, med njimi tudi vrsta gostitelja.

Na podlagi naših rezultatov nismo mogli dokazati, ali je dodani probiotik omilil okužbo z EHEC, saj bi bilo za potrditev te hipoteze potrebno opraviti še več raziskav.

7 VIRI

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45

Al-Ajmi D., Padmanabha J., Denman S.E., Gilbert R.A., Jassim R.A., McSweeney C.S. 2006. Evaluation of a PCR detection method for *Escherichia coli* O157:H7/H: bovine faecal samples. Letters in Applied Microbiology, 42: 386-391

Andlović A. 2002. Patogene bakterije: *Escherichia coli*. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 185-188

Asahara T.K., Shimizu K., Nomoto T., Hamabata A., Ozawa A., Takeda Y. 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infection and Immunity, 72: 2240-2247

Blatnik J., Lešničar G., Šibanc B., Cvitan S. 2002. Okužba z *Escherichia coli* O157:H7 - prikaz primera. Zdravstveni vestnik, 71: 439-441

Bogović Matijašić B., Rogelj I. 2000. *Lactobacillus* K7 – a new candidate for probiotic strain. Food Technology and Biotechnology, 38: 113-119

Bogović Matijašić B., Narat M., Zorič M. 2003 Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. Food Technology and Biotechnology, 41: 83-88

Bogović Matijašić B., Stojković S., Salobir J., Malovrh Š., Rogelj I. 2004. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. Animal Research, 53: 35-44

Bogović Matijašić B., Narat M., Zorič Peternel M., Rogelj I. 2006 a. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pig's jejunal tissue. International Journal of Food Microbiology, 107: 92-96

Bogović Matijašić B., Stojković S., Rogelj I. 2006 b. Survival and *in vivo* adhesion of human isolates *Lactobacillus* LF221 and K7 in weaned piglets and their effects on coliforms, clostridia and lactobacilli viable counts in faeces and mucosa. Journal of Dairy Research, 73: 417-422

Caetano-Anolles G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. PCR Methods and Applications 3, 2: 85-94.

Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2003. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. Journal of Dairy Research, 70, 2: 199-203

Demeria D., Ewaschuk J., Madsen K. 2009. Interactions of *Lactobacillus* with the immune system. V: *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics. Ljungh Å., Wadström T. (eds.). Norfolk, Caister Academic: 139-151

Du Plessis E., Dicks L. 1995. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii*. Current Microbiology, 31: 114-118

FAO/WHO. 2002. Report of a joint working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, April 30 and May 1 2002. London, Ontario, Canada. London, Ontario, FAO/WHO.

http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (13. apr. 2009): 11 str.

Fratamico P.M., Sackitey S.K., Wiedmann M., Deng M.Y. 1995. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33: 2188-2191

Gagnon M., Kheadr E.E., Dabour N., Richard D., Fliss I. 2006. Effect of *Bifidobacterium thermacidophilum* probiotic feeding on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in BALB/c mice. International Journal of Food Microbiology, 111: 26-33

Galdeano C. M., Le Blanc A.M., Vinderola G., Bonet M.E., Perdigón G. 2007. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Clinical and Vaccine Immunology, 14, 5: 485-92

Gardiner G.E., Casey P.G., Casey G., Lynch P.B., Lawlor P.G., Hill C., Fitzgerald G.F., Stanton C., Ross R.P. 2004. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4: 1895-1906

Gardiner G.E., Stanton C., Lynch P.B., Collins J.K., Fitzgerald G., Ross R.P. 1999. Evaluation of Cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. Journal of Dairy Science, 82: 1379-1387

Goldhar J., Zilberberg A., Ofek I. 1986. Infant mouse model of adherence and colonization of intestinal tissues by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. Infection and Immunity, 52, 1: 205-208

Heizmann W., Döller P.C., Gutbrod B., Werner H. 1988. Identification of *Escherichia coli* by Fluorocult media and positive indole reaction. Journal of Clinical Microbiology, 26, 12: 2682-2684

Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H., Vogt P.H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23: 504-511

Hickson M., D'Souza A.L., Muthu N., Rogers T.R., Want S., Rajkumar C., Bulpitt C. 2007. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*, 335: 1-5

Huang J.S., Bousvaros A., Lee J.W., Diaz A., Davidson E.J. 2002. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children. A meta-analysis. *Digestive Diseases Sciences*, 47: 2625-2634

Johnson K.C., Donato K.A., Shen T.G., Gordanpour M., Sherman P.M. 2008. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 induced changes in epithelial barrier function. *Infection and Immunity*, 76, 4:1340-1348

Keohane J., Ryan K., Shanahan F. 2009. *Lactobacillus* in the gastrointestinal Tract. V: *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics. Ljungh Å., Wadström T. (eds.). Norfolk, Caister Academic: 169-181

Koren S. 2002. Bakterija in gostitelj: bakterijski toksini. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 75-88

Koren S., Ihan A., Gubina M. 2002. Bakterija in gostitelj: patogeneza in širjenje bakterijskih okužb. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 65-73

Lawrence L.M., Harvey J., Gilmour A. 1993. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 9: 3117-3119

Lebeer S., Claes J.J., Verhoeven L.A. 2008. Impact of *luxS* and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 4711-4718

Lee Y.K., Lim C.Y., Teng W.L., Ouwehand A.C., Tuomola E.M., Salminen S. 2000. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3692-3697

Macfarlane G.T., Cummings J.H. 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *British Medical Journal*, 318: 999-1003

Medellin P.M., Griffiths M.W. 2009. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4: 1165-1172

Merck. 2006. Microbiology manual: Review of dehydrated culture media. Darmstadt, Nemčija, Merck KGaA.
<http://service.merck.de/microbiology/> (26. apr. 2009): 3 str.

Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117-139

Mullan M.A. 2002. Probiotics. Properties, benefits, mechanisms of action, safety and enumeration. Antrim, Northern Ireland, Dairy Science and Food Technology. (3. feb. 2008)
<http://www.dairyscience.info/probiotics.htm> (20. apr. 2009): 1 str.

Nagano K., Taguchi K., Hara T., Yokoyama S., Kawada K., Mori H. 2003. Adhesion and colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cecum of mice. Microbiology and Immunology, 47, 2: 125-132

Nataro J.P., Kaper J.B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 11, 1: 142-201

Ogawa M.K., Shimizu K., Nomoto M., Takahashi M., Watanuki R., Tanaka T., Hamabata S., Yamasaki T. 2001. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota on shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. Infection and Immunity, 69: 1101-1108

Old R.W., Primrose S.B. 1994. Principles of gene manipulation: an introduction to genetic engineering. 5th ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 178-190

Orel R. 2001. Vloga probiotikov pri preprečevanju in zdravljenju bolezni prebavil. V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe Zbornik predavanj. Ljubljana, 8. marec 2001. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 25-32

O'Sullivan D.J., Kullen M.J. 1998. Tracking of probiotic bifidobacteria in the intestine. International Dairy Journal, 8: 513-525

Palaniappan R.U., Zhang Y., Chiu D., Torres A., Debroy C., Whittam T.S., Chang Y.F. 2006. Differentiation of *Escherichia coli* pathotypes by oligonucleotide spotted array. Journal of Clinical Microbiology, 44, 4: 1495-1501

Paton A.W., Morona R., Paton J.C. 2000. A new biological agent for treatment of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. Nature Medicine, 6, 3: 265-270

Perko B., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2002. Izdelava probiotičnega sira z dodatkom *Lactobacillus gasseri* LF221 (Rif^r) in K7 (Rif^r). Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika, 80, 1: 61-70

Pot B., Tsakalidou E. 2009. Taxonomy and metabolism of *Lactobacillus*. V: *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics. Ljungh Å., Wadström T. (eds.). Norfolk, Caister Academic: 3-58

Reid G. 2008. Probiotics and prebiotics - progreses and challenges. International Dairy Journal, 18: 969-975

Rogelj I. 2001. Probiotiki, prebiotiki, sinbiotiki. V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe. Zbornik predavanj s posvetovanja, Ljubljana, 8. marec 2001. Pavčič M., Vitezić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutricionistov in dietetikov: 6-16

Rogelj I. 1994. Probiotiki. V: Aditivi. 16. Bitenčevi živilski dnevi, Bled, 9. in 10. junij 1994. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 109-118

Rogelj I., Bogovič Matijašić B., Čanžek Majhenič A., Stojković S. 2002. The survival and persistence of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. International Journal of Food Microbiology, 76: 83-91

Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2006. *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 – from isolation to application. Biologija, 61, 6: 761-769

Saarela M., Latheenmaki L., Crittenden R., Salminen S., Mattila-Sandholm T. 2002. Gut bacteria and health foods-the European perspective. International Journal of Food Microbiology, 78: 99-117

SAS Institute. 2001. SAS user's guide: Version 8.2. Cary, SAS Inst. Inc., NC

Seme K. 2002. Bakterija in gostitelj: normalna mikrobnna flora. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 59-64

Sharpe M.E. 1979. Identification of the lactic acid bacteria. V: Identification methods for bacteriologists: Society for Applied Bacteriology. 2nd ed. Skinner F.A., Lovelock D.W. (eds.). London, Academic Press: 233-259

Sherman P.M., Johnson H.K., Yeung H.P., Ngo P.S., Goulet J., Tompkins T.A. 2005. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and enteropathogenic *E. coli* O127:H6 induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. Infection and Immunity, 73, 8: 5183-5188

Shu Q., Gill H.S. 2001. A dietary probiotic reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. Medical Microbiology and Immunology, 189: 147-152

Shu Q., Gill H.S. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. Immunology and Medical Microbiology, 34: 59-64

Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K.J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species. Food Science and Technology, 42: 448-457

Sleator R.D., Hill C. 2008. New frontiers in probiotic research. Letters in Applied Microbiology, 46: 143-147

Smole Možina S., Jeršek B. 2001. Mikrobiološke in molekularne metode karakterizacije probiotičnih dodatkov funkcionalnim živilom. V: Funkcionalna hrana. 21. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 8. in 9. november 2001, Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 207-218

Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87-113

Stojković S. 2003. Preživetje in učinkovitost sevov *Lactobacillus gasseri* K7 in LF221 v različnih okoljskih razmerah. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Ljubljana: 139 str.

Sušić E., Tomić Paradžik M. 2009. Specijalna medicinska bakteriologija: *Enterobacteriaceae*. V: Medicinska mikrobiologija. Uzunović Kamberović S. (ur.). Fojnica, Štamparija: 363-392

Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 10: 4351-4356

Tuomola E.M., Salminem S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. International Journal of Food Microbiology, 41: 45-53

Uzunović Kamberović S. 2009. Patogeneza bakterijskih infekcija. V: Medicinska mikrobiologija. Uzunović Kamberović S. (ur.). Fojnica, Štamparija: 103-116

Uzunović Kamberović S., Smole M.S. 2009. Gram-negativne bakterije uzročnici trovanja hranom. V: Medicinska mikrobiologija. Uzunović Kamberović S. (ur.). Fojnica, Štamparija: 1169-1180

Vanderhoof J. 2000. Probiotics and intestinal inflammatory disorders in infants and children. Journal of Pediatric Gastroenterology, 30: 34-38

Vasiljevic T., Shah N.P. 2008. Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18: 714-728

Vogel F.R. 1996. Specifične metode genske tehnologije pri laktobacilih. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA: 229-244

Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research, 18: 6531-6535

Zhao T.M., Doyle P., Harmon B.G., Brown C.A., Mueller P.O., Parks A.H. 1998. Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. Journal of Clinical Microbiology, 36: 641-647

ZAHVALA

Na prvem mestu bi se rada zahvalila svojim staršem, Vojkotu in Zori, ki so mi omogočili študij, me spodbujali in nikoli podvomili vame.

Posebna zahvala gre mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič, ki mi je vedno z nasmehom in kadarkoli priskočila na pomoč pri pojasnilih in napotkih, ki so ključno pripomogli k polnjenju vrstic tega izdelka.

Zahvaljujem se somentorici dr. Bojani Bogovič Matijašić za strokovno pomoč in usmerjanje pri nastajanju diplomske naloge ter recenzenti doc. dr. Poloni Jamnik za natačen pregled.

Hvala tudi celotnemu osebju laboratorija Katedre za mlekarstvo, zlasti dr. Petri Mohar, ki mi je vedno prijazno svetovala in pomagala pri izvajanju praktičnega dela. Za pomoč pri statistični obdelavi podatkov se zahvaljujem tudi mladima raziskovalcema, Roku Novaku in Biljani Hacin, ker mi je priskrbela slikovni material.

Zahvaljujem se gospe Ivici Hočevare, za pomoč pri navajanju citirane literature ter Barbari Slemenik, za bodrenje in pomoč pri iskanju literature.

Pri pisanju diplomske naloge se moram izdatno zahvaliti fantu Mihu, ki je moral pogosto prenašati moje občasne histerične afekte in je kljub temu verjel vame in v moje sposobnosti, tudi kadar sama nisem.

Hvala tudi vsem prijateljem in sošolcem, ki so naredili moja študijska leta polna smeha in nepozabna.

PRILOGE

Priloga A: Teža organov miši v g

skupina miši	oznaka miši	Masa (g)							
		tanko črevo	debelo črevo	slepo črevo	želodec	jetra	ledvice	vranica	bezgavke
A1	1	0,751	0,184	0,095	0,368	0,704	0,26	0,088	0,291
	3	0,314	0,044	0,086	0,281	0,808	0,201	0,035	0,239
A2	5	0,406	0,09	0,099	0,224	1,026	0,21	0,039	0,229
	2	0,406	0,074	0,057	0,089	0,763	0,162	0,034	0,089
B1	4	0,464	0,087	0,121	0,106	0,64	0,272	0,068	0,316
	1	0,395	0,038	0,139	0,258	0,819	0,228	0,016	0,268
B2	3	0,387	0,047	0,073	0,296	0,761	0,202	0,036	0,155
	5	0,454	0,11	0,979	0,043	0,794	0,201	0,038	0,244
C1	2	0,441	0,089	0,079	0,261	0,773	0,234	0,041	0,313
	4	0,491	0,08	0,054	0,177	0,831	0,255	0,052	0,379
C2	1	0,495	0,085	0,156	0,487	0,967	0,256	0,086	0,967
	3	0,398	0,065	0,056	0,054	0,967	0,236	0,02	0,224
D1	5	0,487	0,073	0,153	0,155	0,89	0,218	0,136	0,275
	1	0,386	0,051	0,107	0,388	0,999	0,227	0,024	0,203
D2	4	0,357	0,137	0,072	0,272	0,989	0,21	0,03	0,319
	1	0,342	0,093	0,119	0,237	1,106	0,236	0,012	0,235
E1	3	0,17	0,051	0,077	0,435	1,011	0,216	0,049	0,278
	5	0,434	0,074	0,074	0,243	1,088	0,222	0,027	0,22
E2	2	0,347	0,077	0,077	0,087	1,138	0,261	0,04	0,333
	4	0,342	0,096	0,087	0,161	1,133	0,182	0,026	0,383
E1	1	0,367	0,116	0,062	0,3	1,131	0,254	0,992	0,488
	3	0,391	0,093	0,072	0,246	1,054	0,258	1,016	0,488
E2	5	0,389	0,07	0,039	0,299	0,965	0,194	0,999	0,434
	2	0,247	0,103	0,105	0,069	1,001	0,161	0,034	0,283
E1	4	0,353	0,072	0,051	0,201	0,935	0,149	0,033	0,23

Priloga B: Prisotnost/odsotnost *E. coli* v izpirkih s plošč ($R = 10^{-3}$) Fluorocult na celotno maso organa

<i>E. coli</i>		Prisotnost/odsotnost kolonij															
skupina miši	oznaka miši	tanko črevo		debelo črevo		slepo črevo		želodec		jetra		ledvice		vranica		bezgavke	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
A1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	3	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A2	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
B1	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	5	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C1	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C2	1	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D1	5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
D2	5	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
E1	4	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	2	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: A – 1. paralelka
 B – 2. paralelka

Priloga C: Prisotnost/odsotnost laktobacilov na gojišču MRS+rif na celotno maso organa

<i>Lb. gasseri</i> K7		Število kolonij															
skupina miši	oznaka miši	tanko črevo		debelo črevo		slepo črevo		želodec		jetra		ledvice		vranica		bezgavke	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
A1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B1	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D1	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: A – 1. paralelka
 B – 2. paralelka

Priloga D1: Povprečja rezultatov štetja kolonijskih enot na posameznih gojiščih, izražena kot log KE/g blata

Gojišče	Čas (tedni)	Povprečja - število celic (log KE/g)				
		skupina A	skupina B	skupina C	skupina D	skupina E
MRS	1	8,457413	8,633567	8,518008	n.p.	n.p.
	2	n.p.	n.p.	7,802411	8,402183	8,522121
	3	8,46972	8,456124	8,335234	8,350431	8,460725
	4	8,414052	9,129933	8,216283	8,322192	8,302577
MRS + rif	1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
	2	n.p.	3,814016	n.p.	6,120354	n.p.
	3	n.p.	4,473603	5,169535	4,800391	n.p.
	4	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
Chromocult Coliform	1	6,66861	6,227681	6,216184	6,240174	n.p.
	2	n.p.	n.p.	6,178728	6,322606	6,085358
	3	6,459381	5,960658	6,044867	6,120804	5,954082
	4	5,950033	6,107811	6,428263	5,982736	5,512415

Legenda: n.p. – ni podatka

Priloga D2: Standardni odkloni štetja kolonijskih enot na posameznih gojiščih, izraženi kot log KE/g blata

Gojišče	Čas (tedni)	SD - število celic (log KE/g)				
		skupina A	skupina B	skupina C	skupina D	skupina E
MRS	1	0,227043	0,149437	0,145811	n.p.	n.p.
	2	n.p.	n.p.	0,463655	0,323658	0,332951
	3	0,257811	0,285144	0,200128	0,344032	0,170867
	4	0,322036	0,433206	0,375498	0,387075	0,20594
MRS + rif	1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
	2	n.p.	0,503766	n.p.	0,233519	n.p.
	3	n.p.	1,145152	0,709903	1,21216	n.p.
	4	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
Chromocult Coliform	1	0,502277	0,254629	0,314278	0,460501	n.p.
	2	n.p.	n.p.	0,667096	0,633883	0,811651
	3	0,754243	0,462984	0,605541	0,774796	0,533316
	4	0,421923	0,689355	0,832379	0,413844	0,587857

Legenda: n.p. – ni podatka