

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja PRIMOŽIČ

**VPLIV UŽIVANJA ANTIBIOTIKOV V KOMBINACIJI
S PROBIOTIČNIM PRIPRAVKOM NA
MIKROBIOLOŠKO SESTAVO BLATA ODRASLIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja PRIMOŽIČ

**VPLIV UŽIVANJA ANTIBIOTIKOV V KOMBINACIJI S
PROBIOTIČNIM PRIPRAVKOM NA MIKROBIOLOŠKO SESTAVO
BLATA ODRASLIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF ANTIBIOTIC THERAPY IN COMBINATION WITH
PROBIOTICS ON FAECAL MICROBIOTA OF ADULTS**

GRADUATION THESIS

University study

Ljubljana, 2012

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 predlagala dr. Bojano Bogovič Matijašić, za recenzentko pa prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: dr. Bojana Bogovič Matijašić

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Primožič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24/.26+579.61:615.33 (043)=163.6
KG probiotiki/probiotične bakterije/antibiotično zdravljenje/antibiotiki/blato odraslih/mikrobne združbe/bifidobakterije/molekularne metode/PCR v realnem času
AV PRIMOŽIČ, Maja
SA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (mentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2012
IN VPLIV UŽIVANJA ANTIBIOTIKOV V KOMBINACIJI S PROBIOTIČNIM PRIPRAVKOM NA MIKROBIOLOŠKO SESTAVO BLATA ODRASLIH
TD Diplomsko delo (Univerzitetna študij)
OP X, 55 str., 13 pregl., 21 sl., 64 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Na odraslih prostovoljcih smo raziskovali učinkovitost probiotičnega pripravka z bakterijskima sevoma *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* Bb-12 in *Lactobacillus acidophilus* La-5 za preprečevanje drisk, ki so posledica terapije z antibiotiki. Cilj naloge je bil ugotoviti, ali uživanje antibiotikov (skupina placebo) oz. antibiotikov in probiotikov (testna skupina) vpliva na koncentracijo (kolonijske enote KE/g blata) naslednjih skupin mikroorganizmov v blatu: rodovi *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, družina Enterobacteriaceae in kvasovke. Vzorci blata za analize so bili odvzeti pred prvo aplikacijo antibiotika in probiotičnega pripravka oz. placebo (začetni vzorec) ter po zadnjem odmerku antibiotika in probiotika oz. placebo (končni vzorec). Število mikroorganizmov smo ugotavljali s konvencionalno metodo štetja kolonij na selektivnih gojiščih. Pri bifidobakterijah smo že leli zastopanost v blatu ljudi iz obeh skupin dokazati tudi s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (PCR v realnem času), ki ne zahteva kultivacije mikroorganizmov. S Studentovim t-testom smo ugotovili, da se testni skupini nista statistično značilno razlikovali v koncentraciji nobene od preiskovanih bakterijskih skupin v blatu. Naših predvidevanj, da se bo koncentracija bifidobakterij in laktobacilov ob koncu zdravljenja z antibiotiki in probiotiki povečala, tako nismo potrdili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24/.26+579.61:615.33 (043)=163.6
CX probiotics/probiotic bacteria/antibiotic therapy/antibiotics/faeces of adults/microbiota/bifidobacteria/molecular methods/real time PCR
AU PRIMOŽIČ, Maja
AA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor) / SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2012
TI INFLUENCE OF ANTIBIOTIC THERAPY IN COMBINATION WITH PROBIOTICS ON FAECAL MICROBIOTA OF ADULTS
DT Graduation Thesis (University Study)
NO X, 55 p., 13 tab., 21 fig., 64 ref.
LA sl
AL sl/en
AB We studied on adult volunteers the efficiency of a commercial probiotic product containing bacterial strains *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 in preventing antibiotic-associated diarrhoea. The aim of our research was to find out if the consumption of antibiotics (control group) or antibiotics and probiotics (probiotic group) affect the concentration (CFU/g faeces) of the following groups of microorganisms in the faeces: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* genera, Enterobacteriaceae family and yeasts. Faecal samples were collected before the first application of antibiotics and probiotic preparation (initial sample) and after the last administration of antibiotics (final sample). We determined the number of microorganisms by conventional plate count method on selective agar media. The number of bifidobacteria in both groups was also determined by quantitative real time PCR, which does not require cultivation of microorganisms. Statistical analysis of results by Student t-test revealed that there was no significant difference between our test groups in the concentration of any of bacterial groups examined. We did not confirm our expectations that concentration of bifidobacteria and lactobacilli in the faeces of individuals who consumed in addition to antibiotics also probiotics would increase.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA VSEBINA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X

1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 MIKROBIOLOGIJA PREBAVNega TRAKTA.....	4
2.1.1 Razvoj črevesne mikrobiote	5
2.1.2 Stimulacija imunskega sistema	6
2.2 ROD <i>Bifidobacterium</i>	6
2.3 ROD <i>Lactobacillus</i>	8
2.4 PROBIOTIKI	10
2.4.1 Značilnosti bakterijskih sevov <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12 in <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5.....	12
2.5 DRISKE, POVEZANE S SPREMENJENO MIKROBIOTO	13
2.5.1 Driske, povezane z antibiotičnim zdravljenjem	13
2.5.1.2 Driske, ki jih povzroča <i>Clostridium difficile</i>	13
2.5.1.3 Epidemiološke značilnosti.....	13
2.5.1.4 Patomorfološke spremembe v črevesu.....	14
2.5.2 Drugi vzroki drisk, povezanih z antibiotičnim zdravljenjem	15
2.5.3 Potovalna driska.....	15
2.6 PCR V REALNEM ČASU	15
2.6.1 Zaznavanje pomnožkov	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 NAČRT POSKUSA	17
3.2 MATERIALI.....	17
3.2.1 Mikroorganizmi.....	17
3.2.2 Gojišča	17

3.2.2.1 Gojišče za bifidobakterije (MRS z mupirocinom in cisteinom)	17
3.2.2.2 Gojišče za laktobacile Rogosa.....	18
3.2.2.3 Gojišče za Enterobacteriaceae (DHL).....	18
3.2.2.4 Gojišče za <i>Staphylococcus</i> (Manitol salt phenol-red agar)	18
3.2.2.5 Gojišče za <i>Enterococcus</i> (KAA)	18
3.2.2.6 Gojišče za kvasovke (OGY).....	18
3.2.3 Anaerobni diluent.....	19
3.3 METODE DELA.....	19
3.3.1 Konvencionalna mikrobiološka analiza s štetjem na ploščah	19
3.3.2 Izračun povprečnih vrednosti štetja na ploščah.....	19
3.3.3 Ugotavljanje statistično značilnih razlik med testno skupino (probiotični pripravek) in kontrolno skupino (placebo).....	20
3.4 MOLEKULARNE ANALIZE	21
3.4.1 Priprava vzorca za molekularne analize	21
3.4.1.1 Liza celic	22
3.4.1.2 Soniciranje.....	22
3.4.1.3 Izolacija DNA iz vzorcev	22
3.4.1.4 Kvantifikacija bifidobakterij s PCR v realnem času	22
3.4.1.4.1 Priprava standardne krivulje.....	22
3.4.1.4.2 Reakcija PCR v realnem času	23
3.4.1.4.3 Preverjanje specifičnosti pomnoževanja	23
4 REZULTATI	25
4.1 REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ S ŠTETJEM NA PLOŠČAH.....	25
4.1.1 Grafični prikaz sestave mikrobne populacije v kontrolni ter testni skupini, pred in po tretiraju z antibiotiki in probiotiki.....	28
4.1.2 Grafični prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike koncentracije bakterij pred in po zdravljenju, v testni in kontrolni skupini	34
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1 RAZPRAVA	44
5.2 SKLEPI	47
6 POVZETEK.....	48
7 VIRI.....	50
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Kolonizacija črevesnih bakterij na mikrovilih (površina tankega črevesja), posneto z elektronskim mikroskopom (Weng in Walker, 2006).....	4
Slika 2: Zdrava mikrobiota (a) in nezdrava mikrobiota (b) v črevesju (Mulder, 2004).....	5
Slika 3: Bifidobakterije, posnete z elektronskim mikroskopom (Biavati in sod., 2000)	8
Slika 4: Laktobacili, posneti z elektronskim mikroskopom (Mulder, 2004)	9
Slika 5: Tipični endoskopski prikaz psevdomembranskega kolitisa zaradi okužbe z bakterijsko vrsto <i>Clostridium difficile</i> (Kuipers in Surawicz, 2008).	14
Slika 6: Povprečne vrednosti (\log_{10} KE/g) in standardni odkloni štetja bakterij rodu <i>Bifidobacterium</i> v blatu preiskovancev.....	28
Slika 7: Povprečne vrednosti (\log_{10} KE/g) in standardni odkloni štetja bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> v blatu preiskovancev.....	29
Slika 8: Povprečne vrednosti (\log_{10} KE/g) in standardni odkloni štetja bakterij rodu <i>Enterococcus</i> v blatu preiskovancev.....	29
Slika 9: Povprečne vrednosti (\log_{10} KE/g) in standardni odkloni štetja bakterij rodu <i>Staphylococcus</i> v blatu preiskovancev.....	30
Slika 10: Povprečne vrednosti (\log_{10} KE/g) in standardni odkloni štetja bakterij družine Enterobacteriaceae v blatu preiskovancev.	30
Slika 11: Povprečne vrednosti (\log_{10} KE/g) in standardni odkloni štetja kvasovk v blatu preiskovancev.....	31
Slika 12: Prikaz statistične obdelave rezultatov.....	32
Slika 13: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu <i>Bifidobacterium</i> pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini.....	34
Slika 14: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini.	35
Slika 15: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu <i>Enterococcus</i> pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini.	36

Slika 16: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu <i>Staphylococcus</i> pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini.	37
Slika 17: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu Enterobacteriaceae pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini.....	38
Slika 18: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila kvasovk pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini.	39
Slika 19: Standardna krivulja za ugotavljanje števila bifidobakterij z metodo PCR v realnem času.....	40
Slika 20: Disociacijska krivulja pomnožkov dela gena za 16S rRNA pri bifidobakterijah pri PCR v realnem času.	41
Slika 21: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu <i>Bifidobacterium</i> , določene z metodo PCR v realnem času, pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni skupini (placebo).	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Porazdelitev mikrobiote v GI-traktu ljudi (Goldin, 2003)	5
Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki se uporabljajo kot probiotiki (Gardiner in sod., 2002).....	11
Preglednica 3: Klinični učinki nekaterih probiotičnih sevov (Mattila-Sandholm in sod., 1999)	12
Preglednica 4: Ciljna skupina bakterij ter uporabljenia selektivna gojišča in pogoji kultivacije za štetje na ploščah.....	17
Preglednica 5: Sestava anaerobnega diluenta.....	19
Preglednica 6: Rezultati štetja na ploščah (KE/g) za bifidobakterije in laktobacile v blatu.	25
Preglednica 7: Rezultati štetja na ploščah (KE/g) za stafilokoke in enterokoke v blatu.....	26
Preglednica 8: Rezultati štetja na ploščah (KE/g) za enterobakterije in kvasovke v blatu.	26
Preglednica 9: Povprečne vrednosti štetja različnih skupin bakterij v blatu preiskovancev. Rezultatom pod mejo detekcije (10000) smo pripisali vrednost 9000.....	27
Preglednica 10: Logaritemske povprečne vrednosti štetja različnih skupin bakterij v blatu preiskovancev. Rezultatom pod mejo detekcije smo pripisali vrednost 9000.	27
Preglednica 11: Standardni odkloni štetja različnih skupin bakterij v blatu preiskovancev. Rezultatom pod mejo detekcije smo pripisali vrednost 9000.	28
Preglednica 12: Rezultati statističnega testiranja povprečja razlik (med začetnimi in končnimi vzorci) za kontrolno in testno skupino.	33
Preglednica 13: Rezultati PCR v realnem času za bifidobakterije	42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S	ribosomska podenota
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Bb-12	<i>Bifidobacterium animalis</i> subspecies <i>lactis</i> Bb-12
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
CFU	colony forming unit
C _t	vrednost, ki pove, kdaj reakcija PCR pride v eksponentno fazo
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GIT	gastrointestinalni trakt
GOS	galaktooligosaharid
GRAS	splošno priznano kot varno (ang. generally recognised as safe)
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
KE	kolonijske enote
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
La-5	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5
NO	dušikov oksid
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PMC	psevdomembranski kolitis
Real-time PCR	metoda PCR v realnem času
subsp.	subspecies (podvrsta)

1 UVOD

Mikrobiota gastrointestinalnega trakta je zelo kompleksen ekosistem. Slina spira bakterije iz ustne votline (zob, dlesni in hrane) v želodec, kjer jih zaradi nizke vrednosti pH želodčnega soka večina pomre. V želodcu je bakterij zelo malo. Bakterijska populacija v tankem črevesju postopoma narašča od duodenuma do distalnega dela ileuma. Na začetku tankega črevesja (duodenum in jejunum) je mikrobiota po sestavi in številčnosti podobna kot v želodcu. V distalnem delu ileuma kompleksnost in koncentracija mikroflore že močno naraste, saj doseže 10^6 – 10^8 bakterij/ml vsebine, prevladujejo pa bakterije rodov *Bacteroides*, *Bifidobacterium* in *Clostridium*. V debelem črevesju število bakterij drastično naraste in doseže vrednosti tudi do 10^{12} /ml blata, kar je 1/3 suhe teže blata. Tudi kompleksnost mikroflore naraste, večinski delež pa predstavljajo striktni anaerobi (Goldin, 2003).

Eden od stranskih učinkov zdravljenja z antibiotiki je diareja. Ta se lahko pojavi kmalu po začetku jemanja, in to pri približno 5–39 % ljudi, odvisno od definicije diareje, vrste antibiotika in mnogo dejavnikov, ki se med posamezniki močno razlikujejo. Mehanizem driske, ki jo povzroči antibiotično zdravljenje, še ni povsem znan. Lahko se pojavi v obliki blažjih prebavnih motenj ali resnih psevdomembranskih kolitisov, ki jih povzroči razraščanje bakterij vrste *C. difficile*. V večini primerov antibiotiki spremenijo normalno mikrobioto v prebavilih, kar vodi do razraščanja patogenov, spremeni se metabolizem ogljikovih hidratov in žolčnih kislin, poveča se produkcija kratkoverižnih maščobnih kislin, nastanejo spremembe v mukoznem in sistemskem imunskejem odzivu. Antibiotiki pa imajo tudi neposreden alergijski in toksični učinek na mukozo v prebavilih, na funkcijo imunskih celic ter gibljivost črevesja.

Zaužitje probiotikov lahko pozitivno učinkuje na prvotno mikrobioto, lahko prepreči tudi porušenje ravnovesja zaradi jemanja antibiotikov in s tem drisko. Kar nekaj probiotičnih sevov (*Lactobacillus (L.) rhamnosus* GG, *Bifidobacterium (B.) longum*, *Enterococcus faecium* in *Saccharomyces boulardii*), ki so jih preizkusili v kliničnih študijah, je dalo spodbudne rezultate. Torej se je število bolnikov z drisko kot stranskim učinkom zmanjšalo. Mnoge študije pa niso pokazale nobenih pozitivnih rezultatov. Dokazano je tudi, da lahko ima kombinacija več vrst probiotičnih bakterij večjo učinkovitost kot probiotični pripravek, ki vsebuje le eno vrsto bakterij, saj imajo probiotične bakterije v kombinaciji sinergističen učinek (Koning in sod., 2007; Timmerman in sod., 2004).

Največ danes znanih probiotičnih mikroorganizmov pripada rodovoma *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, kar je delno posledica njihove tradicionalne povezave z zdravjem, naravne prisotnosti v prebavnem traktu in fermentirani hrani ter tudi statusa GRAS (Generally Recognized as Safe).

Da probiotik opravi svojo pozitivno vlogo v prebavnem traktu, mora najprej preživeti prehod do črevesja in ga vsaj začasno naseliti. To pomeni, da mora uspešno tekmovati za življenski prostor v mikrobeno zelo naseljenem okolju, ki ima zaradi fiziologije gostitelja svoje značilnosti. Odpornost proti nizkim vrednostim pH (želodec) in žolču, proizvodnja protimikrobnih snovi ter sposobnost adhezije na črevesno sluznico so osnovne lastnosti, ki jih morajo imeti probiotični sevi (Klaenhammer in Kullen, 1999; Saarela in sod., 2000). Do nedavnega je veljalo, da bakterije učinkovito inducirajo imunski odgovor in stabilizirajo

črevesno zaščito le, če so se sposobne vezati na črevesno sluznico. Vendar nove raziskave, ki proučujejo komunikacije (angl. crosstalk) med bakterijami in črevesno sluznico, kažejo na to, da adhezija ni vedno nujna. Vsekakor pa izboljša sposobnost tekmovanja s patogenimi bakterijami in njihovo selektivno izločanje s črevesne površine (Ouwehand in sod., 1999; Saarela in sod., 2000).

Uporaba probiotikov kot prehranskih dopolnil je dobila v zadnjih letih izjemne razsežnosti. Lahko rečemo, da se na policah trgovin vsakodnevno pojavljajo novi probiotični izdelki, čeprav so glede vpliva na zdravje le redke probiotične bakterije dovolj znanstveno proučene. Probiotiki so namenjeni predvsem preventivi, to je vzdrževanju ravnotežja črevesne mikrobiote in spodbujanju imunskega sistema v smislu utrjevanja odpornosti organizma. Tako lahko pomagajo preprečevati črevesne infekcije, potovalne driske, driske pri zdravljenju z antibiotiki, zavirati škodljive encimske aktivnosti in preprečevati simptome sekundarne laktozne intolerance (Salminen in sod., 1998a).

Za probiotične preparate veljajo naslednja merila (Hose in Sozzi, 1991):

- vsebovati morajo visoko število živih mikroorganizmov,
- biti morajo obstojni,
- mikroorganizmi morajo čim bolje preživeti prehod skozi GI-trakt,
- mikroorganizmi se morajo biti sposobni naseliti v GI-traktu,
- preparati morajo biti nepatogeni in ne smejo vsebovati toksinov,
- želeno je, da preparati vsebujejo več sevov.

O tem, ali je bolje, če preparati vsebujejo več sevov, so mnenja deljena. Z vključevanjem več sevov sicer lahko razširimo domet delovanja, treba pa je dobro proučiti tudi njihovo medsebojno delovanje, ki je včasih lahko antagonistično. Vsekakor pa morajo preparati dokazano učinkovati na gostitelja. S tehnološkega stališča je zaželeno, da kultivacija bakterij ni prezahtevna ter da dobro preživijo strese, ki so jim izpostavljeni med tehnološkim postopkom.

1.1 NAMEN NALOGE IN DELOVNA HIPOTEZA

Diplomsko delo je del obširnejše študije, v kateri smo na odraslih prostovoljcih raziskovali učinkovitost probiotičnega pripravka z laktobacili in bifidobakterijami za preprečevanje drisk, ki so posledica terapije z antibiotiki. Uživanje antibiotikov za zdravljenje okužb s patogenimi bakterijami spremljajo začasne spremembe v mikrobioti prebavil in blata, kot so zmanjšanje števila vseh bakterij v črevesni sluznici in vsebini črevesne svetline ali spremenjeno razmerje med posameznimi skupinami mikroorganizmov. Posledica sprememb so pogosto tudi driske ali druge prebavne težave. Iz literature je znano, da izbrani probiotični mikroorganizmi lahko pomagajo vzdrževati mikrobiotno ravnotesje v prebavilih in preprečevati omenjene stranske učinke terapije z antibiotiki.

Cilj naloge je bil ugotoviti, ali uživanje antibiotikov (skupina placebo) oz. antibiotikov in probiotikov (testna skupina) vpliva na koncentracijo (kolonijske enote KE/g blata) naslednjih

skupin mikroorganizmov v blatu: rodovi *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, družina Enterobacteriace in kvasovke.

Pri bifidobakterijah smo že leli zastopanost v blatu ljudi iz probiotične skupine in skupine, ki je prejemala placebo, ugotoviti ne samo s kultivacijskimi metodami, ampak tudi s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (PCR v realnem času). Eden od ciljev je bil tudi ugotoviti uporabnost metode PCR v realnem času, ki ne zahteva kultivacije mikroorganizmov, za kvantifikacijo bifidobakterij v blatu.

Delovne hipoteze:

- Uživanje antibiotikov (skupina placebo) oz. antibiotikov in probiotikov (testna skupina) bo vplivalo na koncentracijo (KE/g) izbranih skupin mikroorganizmov (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, Enterobacteriace in kvasovke) v blatu, ugotovljenih z metodo štetja na ploščah.
- V blatu posameznikov, ki bodo med terapijo z antibiotiki in še en teden po končani terapiji uživali probiotični pripravek, bo koncentracija laktobacilov in bifidobakterij večja kot v skupini placebo.
- Morebitne spremembe v koncentraciji bifidobakterij v blatu bo mogoče ugotoviti tudi z metodo PCR v realnem času.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MIKROBIOLOGIJA PREBAVNEGA TRAKTA

Mikrobiota prebavnega trakta je verjetno eden od najkompleksnejših mikrobnih ekosistemov, kar jih poznamo. Naravna mikrobna populacija, ki naseljuje prebavni trakt, je zelo dobro prilagojena in izjemno stabilna, kar so pokazale številne raziskave. Med posamezniki in starostnimi skupinami se zelo razlikuje, pri posamezniku pa je stabilna in močno vpliva na njegovo fiziologijo. Vsaka sprememba v mikrobnem ravnotežju lahko povzroči preobrat iz koristnega v škodljivo delovanje (Fooks in sod., 1999; Gismondo in sod., 1999; Tannock, 2001).

S tem ko se probiotiki vežejo na črevesno sluznico, zasedejo mesto za morebitne patogene bakterije, glivice ali viruse, ki bi sicer kolonizirali črevo. Poleg tega sintetizirajo mnoge metabolite (mlečna, ocetna kislina) in bakteriocine, ki inhibirajo rast nezaželenih mikroorganizmov, ter tako krepijo črevesno sluznico, ki deluje kot bariera (Turpin in sod., 2010).



Slika 1: Kolonizacija črevesnih bakterij na mikrovilih (površina tankega črevesja), posneto z elektronskim mikroskopom (Weng in Walker, 2006)

Človeški prebavni trakt naseljuje okrog 1000 bakterijskih vrst, od tega 30–40 vrst predstavlja 95 % populacije v črevesju. V želodčni vsebini je zaradi kislega okolja in posledično nizke vrednosti pH manj bakterij kot v drugih delih črevesja. Število bakterij v gramu vsebine želodca se giblje pod 10^3 (Bibek in Arun, 2008).

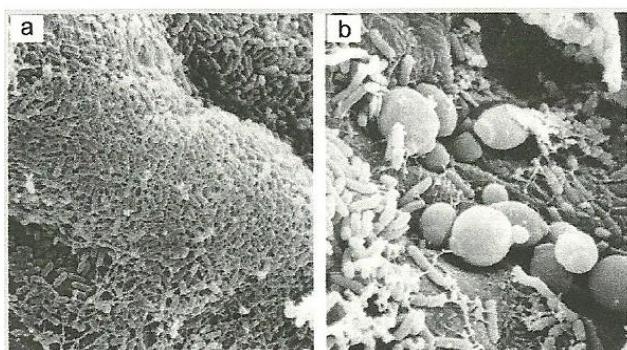
V tankem črevesu (ileum in jejunum) je med 10^6 in 10^7 KE/g črevesne vsebine, v debelem črevesu (kolon) se število bakterij poveča na 10^9 – 10^{10} KE/g. V tankem črevesu prevladujejo številne vrste rodov *Lactobacillus* in *Enterococcus*, v debelem pa družina Enterobacteriaceae in različne vrste *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* in *Lactobacillus* (Bibek in Arun, 2008).

Preglednica 1: Porazdelitev mikrobiote v GI-traktu ljudi (Goldin, 2003)

Odsek v GI-traktu	Vrsta bakterij	Št. bakterij/ml vsebine
Želodec	<i>Streptococcus</i>	10^1 – 10^2
	<i>Lactobacillus</i>	10^1 – 10^2
Duodenum in jejunum	<i>Streptococcus</i>	10^2 – 10^4
	<i>Lactobacillus</i>	10^2 – 10^4
	<i>Veillonella</i>	10^2 – 10^4
Ileum	<i>Bacteroides</i>	10^4 – 10^8
	<i>Clostridium</i>	*
	<i>Streptococcus</i>	*
	<i>Lactobacillus</i>	*
	<i>Enterobacteria</i>	*
Debelo črevo in blato	<i>Bifidobacterium</i>	*
	<i>Bacteroides</i>	10^{11}
	<i>Bifidobacterium</i>	10^{10} – 10^{11}
	<i>Enterobacter</i>	10^{10}
	<i>Peptococcus</i>	10^{10}
	<i>Clostridium</i>	10^{10}
	<i>Fusobacterium</i>	10^9 – 10^{10}
	<i>Streptococcus</i>	10^9 – 10^{10}
	<i>Lactobacillus</i>	10^6 – 10^8
	<i>Veillonella</i>	10^6 – 10^8

Legenda:

*.....ni podatka



Slika 2: Zdrava mikrobiota (a) in nezdrava mikrobiota (b) v črevesju (Mulder, 2004)

2.1.1 Razvoj črevesne mikrobiote

Oblikovanje črevesne mikrobiote se začne takoj po rojstvu. Bakterije iz materinega genitalnega trakta in črevesne vsebine naselijo dojenčkov GI-trakt med porodom. Po treh dneh življenja lahko iz blata izoliramo bakterije rodu *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* in *Enterobacter*. Večinski delež bakterijske populacije (90 %) v blatu sedem dni starih dojenčkov, ki so hranjeni z materinim mlekom, predstavljajo bifidobakterije, medtem

ko pri zalivančkih prevladuje *Enterobacterium*. Pri starosti en mesec prevladujejo bifidobakterije tako pri zalivančkih kot pri dojenčkih, hranih z materinim mlekom. S prehodom na normalno hrano mikrobiota postane kompleksnejša, poveča se število bakterij rodu *Bacteroides* in gram pozitivnih kokov (Goldin, 2003).

Po drugem letu starosti je mikrobiota že podobna kot pri odraslih. Študije, ki so bile opravljene med starejšimi ljudmi (med 70. in 90. letom), pa so pokazale, da se število bakterij *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterobacter* in *Clostridium perfringens* poveča, število rodu *Bifidobacterium* pa zmanjša (Goldin, 2003).

Oblikovanje mikrobiote je tudi genetsko določeno. Tako po rojstvu se mikrobiota prebavnega trakta spreminja hitro, čez čas pa se stabilizira. Spremembe v prehrani, stres in jemanje zdravil (antibiotikov) spremenijo črevesno mikrobioto, ki pa se hitro vrne v prvotno stanje, ko ti dejavniki niso več prisotni. Vaahtovuo in sod. (2003) navajajo, da imajo enojajčni dvojčki bolj podobno mikrobioto kot pa dvojajčni dvojčki.

Miši, ki so bile aklimatizirane pod enakimi pogoji, so en teden prejemale ciprofloxacin in klindamicin. Antibiotik je pričakovano spremenil njihovo črevesno mikrobioto, po končanem prejemanju antibiotikov pa se je v enem tednu obnovila (Vaahtovuo in sod., 2003).

2.1.2 Stimulacija imunskega sistema

Gastrointestinalni trakt je meja med zunanjim in notranjim okoljem, zato kar četrtnino mukoze tvorijo limfatični vozliči, razpršeni limfociti, plazmatke, makrofagi in eozinofilci (Kagnoff in sod., 1995). Zaščitna sluznica, ki prekriva črevesni epitel, je pretežno sestavljena iz mucinskih glikoproteinov, ki jih izločajo čašaste celice. *In vitro* študije na epitelnih celičnih tkivnih kulturah, ki proizvajajo sluz, in študije na gnotobičnih živalih so pokazale, da lahko črevesne bakterije ali pa vnetni mediatorji gostitelja spremenijo izražanje mucinskega gena, sestavo sluzi in izločanje sluzi (Deplancke in Gaskins, 2001).

2.2 ROD *Bifidobacterium*

Bifidobakterije (*B.*) so obvezno anaerobne, negibljive, nesporogene, po Gramu pozitivne paličaste bakterije, ki ogljikove hidrate fermentativno presnavljajo v mlečno in ocetno kislino kot glavna produkta. V človeškem debelem črevesu dosežejo koncentracijo 10^8 – 10^9 KE/g, kar jih uvršča med najpomembnejše organizme črevesne biote. Bifidobakterije humanega izvora uporablja tudi v proizvodnji probiotičnih izdelkov (npr. *B. bifidum*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. longum* in druge vrste). Probiotike nasprotno uporablja tudi pri izdelavi fermentiranih izdelkov, ki niso mlečnega izvora, kot so rastlinski (kislo zelje, razni izdelki iz soje in drugih žitaric), mesni (salame) in ribji izdelki ter izdelki iz stročnic, dodajajo pa jih tudi sadnim sokovom (Adamič in sod., 2003; Rivera-Espinoza in Gallardo-Navarro, 2010).

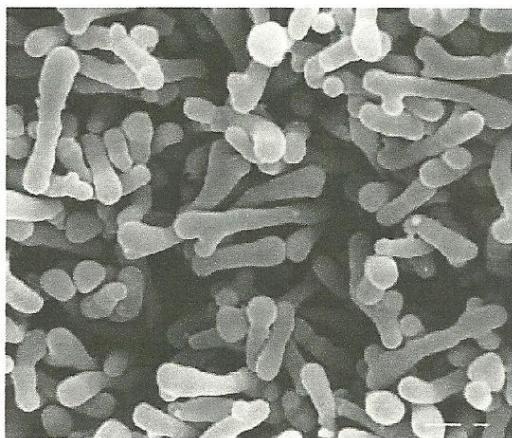
Heksoze razgrajujejo prek posebnih metabolnih poti z encimom fruktoza-6-fosfoketolaza. Optimalno rastejo pri vrednostih pH 6–7. Optimalna temperatura za to je 37–41 °C, rastejo pa tudi pri 43–45 °C, a ne pod 25 °C (Gomes in Malcata, 2006).

Bb-12 je komercialno ime za bakterijski sev vrste *B. animalis* subsp. *lactis*, ki je zaščiteno s strani proizvajalca Chr. Hansen z Danskega. Sev Bb-12 je anaeroben in zelo počasi raste v mleku. Laktodo pretvarja v L-mlečno kislino. Je zelo stabilen in dobro odporen proti kislinam ter produktom fermentacije. Optimalna temperatura za rast seva Bb-12 je 37–40 °C (Chr. Hansen Company, 2001).

Mätto in sod. (2006a) so raziskovali preživelost probiotičnih mikroorganizmov *Lactobacillus* F19, *L. acidophilus* NCFB 1748 in *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 v gastrointestinalnem traktu (GIT) odraslih. Teh mikroorganizmov pred eksperimentom ni bilo v mikrobioti testiranih oseb. Probiotike so zaužili v obliki jogurta. *Lactobacillus* F19 in *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 sta dobro preživela pot skozi GIT, *L. acidophilus* NCFB pa slabše. Odkrili so tudi povečano število bifidobakterij, ki ga niso mogli pripisati sevu *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, zato so sklepali, da je probiotični jogurt pozitivno vplival na razmnoževanje endogenih bifidobakterij. Nekaj tednov po prenehanju uživanja jogurta probiotični mikroorganizmi iz njega niso bili več prisotni v blatu testiranih oseb. Izjema je bila le ena oseba, pri kateri so s kolonoskopijo dokazali adhezijo seva *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 na epitelne celice. Pri njej so v blatu najdevali *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 ves čas trajanja eksperimenta.

Ouwehand in sod. (2000) navajajo, da se v prisotnosti laktobacilov *Lactobacillus* GG in *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* adhezija seva *B. lactis* Bb-12 poveča. Poskus so opravili *in vitro* z radioaktivno označenimi bakterijami, ki so se vezale na humane ileostomske glikoproteine. Vezava seva *B. lactis* Bb-12 se je v prisotnosti navedenih laktobacilov povečala z 18 % na 44 %, če je bil sev inkubiran v prisotnosti obeh. Kombinacija teh bakterij ima torej sinergistični učinek na vezavo črevesnih celic.

Alander in sod. (2001) navajajo, da sta se ob zaužitju sirupa, ki je vseboval 60 % prebiotika galaktooligosaharida (GOS), v kombinaciji z bakterijskim sevom *B. lactis* Bb-12 povečala kolonizacija in preživetje tega seva v gastrointestinalnem traktu ljudi. Prostovoljci so dva tedna pred študijo dvakrat na dan dobivali 125 ml nesladkanega jogurta z nizko vsebnostjo maščob. Nato so jih naključno razdelili v tri skupine po deset ljudi. Prva skupina je dvakrat na dan prejemala samo sirup z GOS, druga samo pripravek z *B. lactis* Bb-12 in tretja oboje. Dnevna doza GOS je bila 8,1 g, *B. lactis* Bb-12 pa 3×10^{10} KE. V tem času se je število seva *B. lactis* Bb-12 v prvih dveh skupinah rahlo povečalo, statistično značilno pa v tretji skupini, ki ga je prejemala v kombinaciji z GOS. Po enem tednu je bilo število bifidobakterij še zmeraj enako, po dveh tednih pa je začelo upadati. Med posamezniki so opazili velike variacije v številu bifidobakterij.



Slika 3: Bifidobakterije, posnete z elektronskim mikroskopom (Biavati in sod., 2000)

2.3 ROD *Lactobacillus*

Bakterije tega rodu spadajo med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije, ki so hkrati najpomembnejša skupina industrijsko uporabnih bakterij v živilstvu. To so po Gramu pozitivne dolge ali kokoidne, negibljive in nesporogene palicice. V okolju z nizko vrednostjo pH po Gramu postanejo negativne. Ne vsebujejo porfirinov in citokromov, nimajo transportne verige elektronov, energijo pa pridobivajo izključno s fermentacijo sladkorjev. Glede odnosa do kisika so aerotolerantni anaerobi. Prehransko so zahtevni, poleg fermentabilnih sladkorjev potrebujejo mnogo rastnih dejavnikov, kot so aminokisline, vitamini in organske baze.

Laktobacili se lahko razmnožujejo pri temperaturah 2–35 °C (odvisno od vrste), optimum je med 30 °C in 40 °C. Rastejo pri vrednostih pH 3,0–7,0, minimalna vrednost a_w za rast pa je okoli 0,90. Glede na končne produkte presnove jih delimo v dve skupini:

- **homofermentativne**, pri katerih je končni produkt razgradnje glukoze mlečna kislina;
- **heterofermentativne**, ki iz glukoze tvorijo mlečno in ocetno kislino ter druge produkte, med njimi pline, npr. ogljikov dioksid (Adamič in sod., 2003).

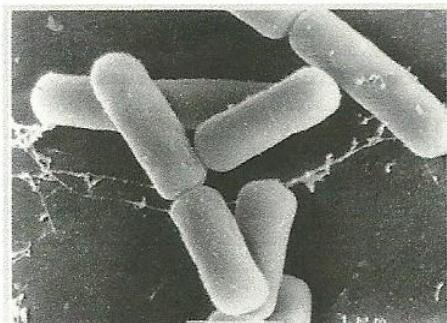
Nekatere vrste laktobacilov lahko izboljšajo izkoristek hraničnih snovi v črevesju. Imajo veliko encimov, zato lahko razgradijo snovi, kot so inulin, α -galaktooligosaharidi in rezistentni škrob, ki sicer neprebavljeni povzročajo napenjanje. Podobno lahko izkoriščajo nekatere antinutritivne snovi, kot so kelati, fitati in tanini, ki v prebavnem traktu delujejo kot kelati in vežejo kovinske ione (železo, cink, magnezij in kalcij).

V manjših količinah lahko sintetizirajo tudi vitamine, posebno tiste iz skupine B (riboflavin, folat in kobalamin). Tako je npr. *L. plantarum* WCFS1 sposoben sintetizirati 6 ng folata/ml krvne plazme, *L. plantarum* TSB 304 pa 16 ng folata/l krvne plazme. Nekateri, kot je *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CSCC 5168 in CSCC 2505, pa porabljajo folat. Vsekakor pa je produkcija teh vitaminov pod priporočeno dnevno dozo, tako da jih je treba zagotavljati s hrano (Turpin in sod., 2010).

S pripenjanjem na epitelne celice lahko okrepijo črevesno obrambo pred patogenimi bakterijami tako, da zasedejo mesto vezave ali s sintezo raznih metabolitov (mlečna in ocetna kislina, H_2O_2 , NO, bakteriocini) zavrejo njihov razvoj.

La-5 je komercialno ime za bakterijski sev vrste *Lactobacillus acidophilus*. Ime je zaščiteno s strani proizvajalca Chr. Hansen z Danskega. Gre za mikraerofilno kulturo, ki počasi raste v mleku. Laktozo pretvarja v D-mlečno kislino. Optimalna temperatura rasti La-5 je med 37 in 40 °C (Chr. Hansen Company, 2001).

Številni sevi vrste *Lactobacillus acidophilus*, med njimi tudi sev La-5, so probiotični. Ta vrsta je sicer pomemben del mikrobiote GI-trakta. Medellin-Pena in Griffiths (2008) sta dokazala, da *L. acidophilus* La-5 proizvaja biološko aktivne molekule, ki pri enterohemoragični *E. coli* (EHEC) 0157:H7 zavirajo produkциjo signalnih molekul AI-2 (avtoinducer). Te so ob zadostni koncentraciji odgovorne za izražanje določenih genov pri EHEC 0157:H7, ki izražajo virulentne faktorje. Poskus so opravili *in vitro* na Hep-2 in HeLa celičnih kulturah in *in vivo* na miših. Pri obeh poskusih so ugotovili, da *L. acidophilus* La-5 vpliva na sistem celične signalizacije (AI-2), s tem zmanjša virulenco EHEC 0157:H7 in posledično prepreči adhezijo na epitelne celice.



Slika 4: Laktobacili, posneti z elektronskim mikroskopom (Mulder, 2004)

Okužba z bakterijo *Helicobacter pylori* je povezana z gastritisom in ulkusom na želodcu in dvanajstniku ter celo z malignomom. Uspeha zdravljenja s probiotiki niso ugotovili, pri uživanju bakterijske vrste *Lactobacillus johnsonii* pa so opazili zmanjšano aktivnost encima ureaze (Bazzoli in sod., 1992; Michetti in sod., 1999).

Dommels in sod. (2009) so raziskovali preživetje *Lactobacillusa reuterija* DSM 17938 in *Lactobacillusa rhamnosusa* GG v gastrointestinalnem traktu ljudi, ki so uživali probiotični namaz z nizko vsebnostjo maščob. V študijo je bilo vključenih 42 posameznikov, ki so jih razdelili v tri skupine. Prva skupina (placebo) je dnevno prejemala 20 g namaza brez probiotičnih kultur, druga po 20 g namaza, ki je vseboval 5×10^9 KE/g seva *L. reuteri* DSM 17938, in tretja skupina 20 g namaza s kulturo *L. rhamnosus* GG v koncentraciji 5×10^9 KE/g. Poskus je trajal tri tedne, vzorce blata so analizirali pred začetkom poskusa in ob koncu. V prvi skupini (placebo) ni bilo statistično značilne razlike, v drugih dveh skupinah pa se je po treh tednih število laktobacilov povečalo. Uporabili so metodo štetja na plošči, ki so jo podprtli tudi s kvantitativno analizo PCR.

2.4 PROBIOTIKI

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki, dodani hrani ali krmi, vplivajo na fiziologijo gostitelja tako, da okrepijo črevesni in sistemski imunski odgovor ter izboljšajo prehransko in mikrobiološko ravnovesje v prebavilih (Naidu in sod., 1999).

Uživanje fermentiranih mlečnih izdelkov je povezano tudi z znižanjem ravni serumskega holesterola pri ljudeh. To pripisujejo dvema možnima vzrokoma. Nekateri laktobacili so sposobni metabolizirati holesterol iz hrane, s čimer se zmanjša količina absorbiranega holesterola. Drugi možni vzrok pa je, da lahko nekateri laktobacili dekonjugirajo žolčne soli, ki se tako ne morejo reabsorbirati v kri. Tako jetra za sintezo žolča uporabijo serumski holesterol, kar posledično povzroči znižanje koncentracije serumskega holesterola v krvi (Bibek in Arun, 2008).

Sevard in sod. (2011) so v klinični študiji ugotavljali vpliv uživanja probiotičnega jogurta, ki je vseboval seva *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 in *L. acidophilus* La-5, na število teh bakterij v blatu odraslih ter ne vsebnosti trigliceridov in holesterola v krvi. Pred eksperimentom so prostovoljcem izmerili težo, obseg pasu, krvni tlak in vsebnost maščob v krvi. Izvidi so bili v mejah normale, kontrolna (placebo) in testna skupina pa se pred poskusom med seboj nista bistveno razlikovali. Po štirih tednih uživanja jogurta se je pri testni skupini število bakterijskih sevov *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 in *L. acidophilus* La-5 v primerjavi s kontrolno skupino bistveno povečalo. Skupno število anaerobnih bakterij, *Bacteroides*, klostridijev in enterobakterij se ni bistveno spremenilo, zmanjšalo pa se je število potencialno patogenih enterokokov. Tudi telesna teža, obseg pasu, krvni tlak in trigliceridi ter holesterol v krvi so ostali nespremenjeni.

Ataie-Jafari in sod. (2009) so dokazali, da je uživanje probiotičnih jogurtov v primerjavi z navadnimi pri moških s povišanimi vrednostmi serumskega holesterola opazno znižalo vrednosti.

Laktozna intoleranca je posledica nizkih koncentracij (hipolaktazija) encima β -galaktozidaze, ki razgraje mlečni sladkor (laktozo) na galaktozo in glukozo, ali pa odsotnosti tega encima (alaktazija) v celicah črevesnega epitela. Neprebavljeni in zato neabsorbirana laktoza povzroči z osmozo pogojeno izločanje vode v tankem črevesu, skrajšuje čas prehoda črevesne vsebine po prebavni cevi in moti absorpcijo vode v debelem črevesu, kjer postane substrat za fermentacijo. To povzroči slabost, drisko in napenjanje. Fermentirani mlečni izdelki vsebujejo manj laktoze kot mleko, poleg tega pa mlečnokislinske bakterije pri prehajanju skozi želodec prispevajo k sproščanju laktaze, zato bolniki takšne izdelke prenašajo bolje od mleka (Fuller, 1991; Orel, 2001).

Probiotiki lahko koristno učinkujejo tudi pri preprečevanju raka debelega črevesa, tako da zavirajo rast bakterij, ki z izločanjem encimov aktivirajo prokancerogene spojine v kancerogene (nitritne in azoučinkovine), ter zmanjšajo obremenitve črevesa in organizma s kancerogeni (Orrhage in sod., 1994). Že Goldin in Gorbach (1984) sta navajala, da *L. acidophilus* N-2 inhibira delovanje encimov β -glukuronidaze, nitroreduktaze in azoreduktaze.

Probiotiki pa proizvajajo tudi kratke maščobne kisline, kot sta propionat in butirat, ki povečujejo frekvenco izločanja blata, s čimer se zmanjša koncentracija kancerogenih spojin in encimov v črevesju ter posledično incidenca raka na debelem črevesu (Parvez in sod., 2006; Bibek in Arun, 2008). Butirat ima ugoden učinek na DNA, pospešuje razmnoževanje normalnih enterocitov, zavira razmnoževanje že spremenjenih celic in poveča odpornost celic proti oksidativnim okvaram, npr. z vodikovim peroksidom (Treptow-van Lishaut in sod., 1999).

Mlečnokislinske bakterije lahko tudi na svojo celično steno vežejo mutagene oz. kancerogene snovi, npr. heterociklične amine, ki nastajajo pri pečenju mesa.

Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki se uporabljajo kot probiotiki (Gardiner in sod., 2002)

Laktobacili	Bifidobakterije	Enterokoki	Ostali
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. johnsonii</i>			<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>			<i>Escherichia coli</i>
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. reuteri</i>			

Legenda:

subsp.....podvrsta

Preglednica 3: Klinični učinki nekaterih probiotičnih sevov (Mattila-Sandholm s sod., 1999)

Probiotični sev	Klinični učinki pri ljudeh
<i>Lactobacillus GG</i> ATCC 53103	vezava na črevesne celice, zmanjšanje fekalne encimske aktivnosti, preprečevanje drisk (antibiotiki, akutne), zdravljenje in preprečevanje rotavirusnih drisk, modulacija imunskega odgovora
<i>Lactobacillus johnsonii</i> LJ-1 (LA-1)	preprečevanje potovalne driske, modulacija črevesne mikrobiote, blaženje simptomov laktozne intolerance, izboljšanje imunske odpornosti, pomoč pri zdravljenju okužb z bakterijo <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Bifidobacterium lactis</i> (<i>bifidum</i>) Bb-12	preprečevanje potovalne driske, zdravljenje virusnih drisk (tudi rotavirusne), modulacija črevesne mikrobiote, izboljšanje imunske odpornosti
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	naselitev črevesa, skrajšanje rotavirusne driske, zdravljenje akutnih drisk
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	modulacija črevesne mikrobiote, zmanjšanje fekalne encimske aktivnosti, zaviranje raka na mehurju
<i>Saccharomyces boulardii</i>	preprečevanje drisk pri zdravljenju z antibiotiki, zdravljenje kolitisov, ki jih povzroča <i>Clostridium difficile</i>

2.4.1 Značilnosti bakterijskih sevov *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 in *Lactobacillus acidophilus* La-5

Kot probiotike največ uporabljam laktobacile in bifidobakterije. Oba rodova sta tudi del normalne črevesne mikrobiote. Poleg mlečne kisline lahko različni sevi izločajo še vodikov peroksid in bakteriocine (Alvarez-Olmos in Oberhelman, 2001).

Sev *B. animalis* subsp. *lactis* (Bb-12) je iz vrste bifidobakterij, ki jo zelo pogosto uporabljam za probiotične izdelke. Odlikuje ga tudi dobra stabilnost med skladiščenjem (Mätto in sod., 2006b).

Probiotični pripravek, ki ga je prejemala testna skupina, je vseboval *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in *B. animalis* subsp. *lactis* (Bb-12). To sta predstavnika vrst, ki sta del normalne črevesne mikrobiote.

Seva La-5 in Bb-12 učinkujeta preventivno in terapevtsko prek več možnih mehanizmov delovanja.

Rast patogenih bakterij onemogočata:

- z zniževanjem pH v črevesju (posledica sposobnosti La-5, da proizvaja mlečno kislino, in Bb-12, ki poleg mlečne kisline proizvaja tudi ocetno in jantarno kislino);
- s tvorbo presnovkov, ki so toksični za patogene bakterije (tvorba H_2O_2);
- s tvorbo protimikrobnih snovi (La-5 izloča širokospikalni bakteriocin, ki zavira rast bakterij in gliv);
- tako, da s patogenimi bakterijami tekmujeta za hranilne snovi;
- z vezavo na receptorje na enterocitih in preprečevanjem kolonizacije drugih mikroorganizmov, med katerimi so tudi potencialno patogeni.

Porušeno ravnoesje črevesne mikrobiote, ki lahko nastane zaradi številnih dejavnikov (virusne in bakterijske črevesne okužbe, potovanja v tujino, zdravljenje s širokospikalnimi antibiotiki in kemoterapevtiki, obsevanje trebušnih in medeničnih organov), ali zakasnela vzpostavitev normalne črevesne mikrobiote pri dojenčkih lahko povzročijo želodčno-črevesne motnje, kot so napenjanje, driske ali zaprtje (Javna agencija ..., 2008).

2.5 DRISKE, POVEZANE S SPREMENJENO MIKROBIOTO

2.5.1 Driske, povezane z antibiotičnim zdravljenjem

Antibiotično zdravljenje pogosto spremi pojav driske. Pogostost zapletov je odvisna tudi od izbire antibiotika. Driska se pojavi pri 5–10 % pacientov, ki prejemajo ampicilin, pri 10–25 % prejemnikih amoksicilina, 15–20 % prejemnikih cefiksima in pri 2–5 % pacientov, ki jih zdravijo z drugimi antibiotiki, kot so cefalosporini, fulorokinolon, azitromicin, claritromicin, eritromicin in tetraciklin (Barlett, 2002).

Pojav driske pripisujejo uničenju normalne črevesne mikrobiote in s tem zmanjšanju naravne obrambe pred patogenimi klicami ter zmanjšani fermentacijski kapaciteti mikrobiote v kolonu (Orel, 2001).

2.5.1.2 Driske, ki jih povzroča *Clostridium difficile*

Clostridium difficile je anaerobna, po Gramu pozitivna bakterijska vrsta. Tvori najmanj tri različne toksine: termolabilen enterotoksin A, citotoksin B ter tretji toksin, ki je še malo raziskan. *C. difficile* je pogojno patogena vrsta.

Bakterije te vrste uvrščamo med najpomembnejše povzročitelje drisk, ki se pojavljajo ob antibiotičnem zdravljenju in po njem, ter med pogoste povzročiteljice bolnišničnih črevesnih okužb. V črevesju povzročajo vnetne spremembe, v skrajnem primeru tudi psevdomembranski kolitis (Radšel-Medvešček, 2002).

2.5.1.3 Epidemiološke značilnosti

Bakterijska vrsta *C. difficile* je prisotna v normalni črevesni mikrobioti, zlasti pri dojenčkih. Pri raziskavah so v blatu zdravih, manj kot en mesec starih dojenčkov, to bakterijsko vrsto

odkrali v 4–44 %, v blatu otrok, starih 18 mesecev pa v 64 %. V blatu odraslih so njen prisotnost ugotovili pri približno 3 % populacije. V normalnih pogojih v črevesju ostala mikrobna populacija toksine *C. difficile* razgradi.

Ko pa se črevesno mikrookolje spremeni, se bakterije te vrste lahko začnejo razraščati in tvoriti toksine, katerih posledica so različno hude vnetne spremembe v črevesni sluznici ali celo psevdomembranski kolitis (PMC). *C. difficile* so ugotovili pri skoraj vseh bolnikih s PMC ter pri 50–70 % bolnikov s kolitiso, povezanim z antibiotičnim zdravljenjem (Radšel-Medvešček, 2002).

2.5.1.4 Patomorfološke spremembe v črevesu

Klostridiji se v črevesu pritrdirjo na epitelijске celice sluznice in se razmnožujejo. Začnejo izločati dva toksina, ki povzročata kolitis in diareje, enterotoksin A in toksin B.

Enterotoksin A se veže na specifične ogljikohidratne receptorje, vstopi v citoplazmo in inaktivira beljakovine Rho, ki nadzorujejo citoskeletalne in druge procese. Povzroči poškodbo celičnega mikroskeleta v črevesnih celicah in poveča prepustnost med celicami. Posledice so izločanje tekočine iz črevesnih celic v svetlico črevesja ter vnetje in hemoragične nekroze v črevesni sluznici.

Toksin B je citotoksin, ki povzroča prekinitev aktinskih vlaken v celicah, propad celic in nabiranje celičnih ostankov kot psevdomembran. Te so sestavljene iz fibrina, sluzi, odmrlih epitelijskih in vnetnih celic ter lahko prekrivajo precejšne dele črevesne sluznice ali pa so majhne in raztresene v obliki manjših belkastih oblog (Radšel-Medvešček, 2002).



Slika 5: Tipični endoskopski prikaz psevdomembranskega kolitisa zaradi okužbe z bakterijsko vrsto *Clostridium difficile* (Kuipers in Surawicz, 2008).

2.5.2 Drugi vzroki drisk, povezanih z antibiotičnim zdravljenjem

Vzroki drisk, povezanih z antibiotičnim zdravljenjem, so lahko tudi druge enteropatogene bakterije, kot so salmonele, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus* ali *Candida albicans* (Sparks in sod., 2001).

Antibiotiki precej zmanjšajo koncentracijo anaerobnih bakterij, ki so normalno prisotne v črevesju. Kot posledica se zmanjša metabolizem ogljikovih hidratov, ki ostanejo neprebaavljeni v svetlini črevesja, kar lahko povzroči osmotsko diarejo (Gustafsson in sod., 1999).

2.5.3 Potovalna driska

Najpogostejši povzročitelji potovalnih drisk zaradi uživanja presne hrane, neopranih živil in neprekuhane vode so enterotoksigeni sevi *Escherichia coli* (izločajo termostabilne toksine), šigele, salmonele, *Campylobacter jejuni* ter druge bakterije, različni virusi in zajedalci. Nekatere študije kažejo ugoden učinek probiotikov na preprečevanje potovalnih drisk, druge pa ne. V ta namen se uporabljajo probiotiki iz vrst *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, *S. thermophilus*, *L. rhamnosus* in *Saccharomyces boulardii* (Black in sod., 1989; Oksanen in sod., 1990).

2.6 PCR V REALNEM ČASU

Reakcija verižnega pomnoževanja (PCR) v realnem času je molekularna metoda, ki omogoča specifično kvantifikacijo bakterij v različnih vzorcih. Najpogosteje kot tarčo pomnoževanja s PCR uporabijo gen za 16S podenoto ribosomske RNA (16S rRNA), na katerem je mogoče najti zaporedja nukleotidov, specifična za posamezne vrste ali rodove bakterij. Metoda deluje po principu temperaturno programiranih ciklov. En cikel sestoji iz treh stopenj:

- denaturacija dvostranske DNA pri 94–95 °C,
- vezava začetnih nukleotidov pri 37–65 °C na enoverižne DNA,
- pomnoževanje tarčnega odseka s topotno stabilnim encimom pri 72 °C.

Theoretično naj bi se na koncu vsakega cikla število PCR-pridelkov podvojilo in skozi sledeče cikle eksponentno naraščalo. V praksi temu ni tako, saj število pomnožkov PCR doseže plato, ko pride do zasičenja (Busch in Nitschko, 1999).

PCR je zelo specifična in občutljiva metoda. Predpogoj za uspešno in selektivno pomnoževanje je predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela genoma bakterije (Poljak in sod., 1994). Na specifičnost pomnoževanja vpliva izbira tarčne sekvene, posledično pravilen izbor oligonukleotidnih začetnikov ter ustrezne koncentracije reagentov v reakcijski mešanici. Za specifičnost je pomembna tudi izbira optimalne temperature prileganja začetnih nukleotidov ter število ciklov (Poljak in sod., 1994; Schmidt, 1997).

Klasična PCR je navadno kvalitativna reakcija, kjer pomnožke analiziramo s pomočjo gelske elektroforeze ob koncu reakcije (Mackay, 2004). PCR v realnem času pa je kvantitativna metoda, pri kateri pomnožke detektiramo med samim pomnoževanjem, ob začetku

logaritmične faze pomnoževanja (Read, 2001). Z upočasnjevanjem reakcije se namreč kopijo nezaželeni dejavniki, encimi in substrati so izkoriščeni, pH se spremeni in kopijo se toksični stranski produkti. Zato je zaznavanje produktov v zgodnji eksponencialni fazi veliko bolj relevantno za kvantifikacijo.

2.6.1 Zaznavanje pomnožkov

Da lahko zaznamo pomnožke, ki nastajajo v reakciji PCR in se v reakcijski mešanici kopijo, potrebujemo označevalce, ki se vežejo na nastale pomnožke. V ta namen se najpogosteje dodajajo barvila, kot je SYBR Green, neposredno v reakcijsko mešanico.

Fluorogeno barvilo SYBR Green se veže na vsako dvojnovečno DNA, kar se je izkazalo tako za prednost kot za slabost, saj se posledično veže tudi na nespecifične pomnožke PCR in dimere oligonukleotidnih začetnikov. Jakost fluorescentnega signala je sorazmerna s koncentracijo dvovijačne DNA v reakciji. V prosti obliki v raztopini je jakost fluorescence šibka, ob vezavi na dvovijačno DNA pa se okrepi. Prednosti metode so cenovna dostopnost in možnost uporabe s številnimi oligonukleotidnimi začetniki (Gibellini in sod., 2004). Specifičnost tovrstnih reakcij PCR vedno preverimo z disociacijsko analizo produktov reakcije PCR (angl. melting curve analysis), saj imajo odseki DNA z različno sestavo ali dolžino različne temperature disociacije. Kadar v reakciji PCR pomnožimo le en odsek DNA, ima disociacijska krivulja le en vrh. Upoštevati velja tudi, da daljši pomnožki povzročajo močnejši fluorescentni signal (Arya in sod., 2005).

Ugotavljanje koncentracije DNA oz. posredno mikroorganizmov v vzorcu je mogoče s pomočjo standardne umeritvene premice, ki jo dobimo tako, da vzorce z znano (standardno) koncentracijo DNA oz. bakterij pomnožujemo s PCR. Pridobljene vrednosti C_t neznanih vzorcev tako primerjamo z odgovarjajočimi koncentracijami standardnih vzorcev. Vrednost C_t pove, pri katerem številu ciklov fluorescencija preseže prag oz. kdaj reakcija pride v eksponentno fazo. Fluorescencija, ki se beleži med reakcijo pomnoževanja v realnem času, je sorazmerna s koncentracijo pomnožkov (Gibson in sod., 1996).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

V študijo je bilo vključenih 17 odraslih prostovoljcev s predpisano antibiotično terapijo, ki so poleg predpisanih antibiotikov uživali še probiotični pripravek oz. placebo. Tega so dobivali ves čas antibiotične terapije in še en teden po zadnjem odmerku antibiotika. Od vsakega prostovoljca smo dobili po dva vzorca blata. Prvi (začetni) vzorec je bil odvzet pred začetkom terapije z antibiotiki in probiotiki oz. placebo, drugi (končni) pa takoj po končanem jemanju probiotičnega pripravka oz. placebo. Ugotavljalci smo število KE/g bifidobakterij, laktobacilov, enterokokov, stafilokokov, enterobakterij in kvasovk. Najprej smo nacepili vzorce blata odraslih prostovoljcev na različna selektivna gojišča (MRS z dodatkom mupirocina in cisteina, Rogosa z dodatkom ocetne kisline, KAA, Manitol, OGY z dodatkom oksitetraciklina) za ugotavljanje števila (KE/g) različnih skupin bakterij z metodo štetja na ploščah. Vzporedno smo iz blata izolirali DNA in vzorce hranili do analize pri -20°C . Število bifidobakterij smo ugotavljalci tudi z molekularno metodo PCR v realnem času.

3.2 MATERIALI

3.2.1 Mikroorganizmi

Preglednica 4: Ciljna skupina bakterij ter uporabljeni selektivni gojišči in pogoj kultivacije za štetje na ploščah

BAKTERIJE	GOJIŠČE	INKUBACIJA	ATMOSFERA
<i>Bifidobacterium</i>	MRS mup,cys	37 °C/48–72 h	anaerobno
<i>Lactobacillus</i>	ROG	37 °C/48–72 h	anaerobno
<i>Enterococcus</i>	KAA	37 °C/48–72 h	aerobno
<i>Staphylococcus</i>	MAN	35 °C/72 h	aerobno
Enterobactericeae	DHL	35 °C/24–48 h	aerobno
kvasovke	OGY	28 °C/7 dni	aerobno

Legenda:

MRS.....gojišče po deMan, Rogosa in Sharp (1960)

ROG.....gojišče po Rogosa (1951)

KAA.....agar s kanamycinom in eskulinom

DHL.....deoksiholat hidrogen sulfid laktozni agar

MAN.....manitol fenol-rdeč agar

OGY.....oksitetraciklin glukoza kvasni agar

mup.....mupirocin

cys.....cistein

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 Gojišče za bifidobakterije (MRS z mupirocinom in cisteinom)

52,2 g dehidriranega bujona MRS (Merck) smo dodali 900 ml demineralizirane vode, uravnali pH na 6,7 (6,3 po avtoklaviranju), dopolnili do 1 L in po 200 ml razdelili v stekleničke s 3 g agar-agarja (Merck). Gojišče smo avtoklavirali. Ohlajenemu gojišču (46°C) smo pred razlivanjem na plošče dodali 1 ml mupirocina (10 mg/ml) v 200 mg gojišča, tako da je bila

končna koncentracija v gojišču 0,05 mg/ml. Dodali smo še 2 ml 5-odstotne založne raztopine cistein hidroklorida (Merck), tako da je bila končna koncentracija 0,05-odstotna. Sestava gojišča je povzeta po gojišču BSM avtorjev Leuschner in sod. (2003). Za razliko od omenjenega članka smo uporabili mupirocin v prahu (AppliChem), iz katerega smo pripravili založno raztopino in ga dodali gojišču, kakor je opisano zgoraj.

3.2.2.2 Gojišče za laktobacile Rogosa

Pripravili smo ga po navodilih proizvajalca (Merck), tako da smo zatehtali 14,9 g dehidriranega gojišča (Merck) v 200 ml demineralizirane vode. Gojišče smo avtoklavirali. Ohlajenemu gojišču (45 °C) smo pred razlivanjem na plošče dodali 260 µl/200 ml 96-odstotne ocetne kisline (Merck).

3.2.2.3 Gojišče za Enterobacteriaceae (DHL)

Deoksiholat hidrogen sulfid laktoza agar (Merck) smo pripravili po navodilih proizvajalca. Zatehtali smo 12,7 g dehidriranega gojišča DHL v 200 ml demineralizirane vode, raztopili v mikrovalovni pečici in razlili na plošče. Gojišča se ne avtoklavira.

3.2.2.4 Gojišče za *Staphylococcus* (Manitol salt phenol-red agar)

Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca, tako da smo 21,6 g dehidriranega gojišča dodali v 200 ml demineralizirane vode, avtoklavirali in primerno ohlajenega takoj razlili na plošče.

3.2.2.5 Gojišče za *Enterococcus* (KAA)

Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca, tako da smo 9,5 g dehidriranega gojišča dodali v 200 ml demineralizirane vode in avtoklavirali.

3.2.2.6 Gojišče za kvasovke (OGY)

Gojišče OGY (oksitetraciklin glukoza kvasni agar) (Merck) smo pripravili po navodilih proizvajalca. 15 g dehidriranega gojišča smo raztopili v 500 ml demineralizirane vode in avtoklavirali. Ko je bilo gojišče primerno ohlajeno (46 °C), smo dodali vsebino 1 viale (10 ml) oksitetraciklina (Merck) in razlili v petrijevke.

3.2.3 Anaerobni diluent

Preglednica 5: Sestava anaerobnega diluenta

SESTAVINE	KOLIČINA
pepton	2 g
želatina ("porcine gelatine")	4 g
NaCl	17 g
cistein hidroklorid monohidrat	1,114 g
destilirana voda	2 L

Sestavine smo raztopili z mešalom, nato smo po 9 ml razdelili v epruvete oz. v 200 ml stekleničke in avtoklavirali.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Konvencionalna mikrobiološka analiza s štetjem na ploščah

Vzorce, hranjene pri -20°C , smo najprej odtalili ter zatehtali v sterilne plastične centrifugirke (12 ml) po 0,1 g blata. Za homogeniziranje in razredčevanje smo uporabljali anaerobni diluent, ki smo ga ogreli na sobno temperaturo. Celotni postopek je potekal v aseptičnih pogojih. Zatehtanemu blatu smo aseptično dodali 9 ml sterilnega anaerobnega diluenta. Sledilo je mešanje (1 min) na vrtičniku (Vortex). To razredčitev smo označili kot 10^{-2} . S sterilno pipeto smo prenesli 1 ml suspenzije vzorca v naslednjo epruveto z 9 ml anaerobnega diulenta (razredčitev 10^{-3}). Postopek razredčevanja smo ponavljali do 10^{-7} . 1 ml ustrezno razredčenega vzorca smo prenesli na petrijeve plošče in prelili s približno 10 ml selektivnega gojišča MRS z dodatkom mupirocina in cisteina (anaerobna kultivacija, $37^{\circ}\text{C}/48\text{--}72\text{ h}$), ROG z dodatkom ocetne kisline (anaerobna kultivacija, $37^{\circ}\text{C}/48\text{--}72\text{ h}$) in KAA (aerobna kultivacija, $37^{\circ}\text{C}/48\text{--}72\text{ h}$). Gojišča smo ohladili na 46°C . Gojišča DHL (aerobna kultivacija, $35^{\circ}\text{C}/24\text{--}48\text{ h}$), MAN (aerobna kultivacija, $(35^{\circ}\text{C}/72\text{ h})$ in OGY z dodatkom oksitetraciklina (aerobna kultivacija, $28^{\circ}\text{C}/7\text{ dni}$) so bila že predhodno razlita na plošče, zato smo razredčene vzorce nanašali z razmazom 0,1 ml na površino. Vse analize smo opravili v paralelkah.

Po končani inkubaciji smo zrasle kolonije prešteli s pomočjo elektronskega števca.

3.3.2 Izračun povprečnih vrednosti štetja na ploščah

Število kolonijskih enot v gramu vzorca (KE/g) smo izračunali po sledeči formuli (IDF Standard 100B, 1991):

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d} \left[\frac{CFU}{g} \right] \quad \dots(1)$$

Legenda:

N: število KE (kolonijske enote) oz. KE/ml oz. g

ΣC: vsota vseh kolonij

n₁: število plošč prve razredčitve

n₂: število plošč druge razredčitve

d: razredčitveni faktor prve razredčitve

Povprečno vrednost smo izračunali po sledeči formuli (Košmelj, 2001):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad \dots(2)$$

Legenda:

\bar{x} ... povprečna vrednost

N ... število vzorcev

X_i ... posamezni vzorec

3.3.3 Ugotavljanje statistično značilnih razlik med testno skupino (probiotični pripravek) in kontrolno skupino (placebo)

Od vsakega posameznika smo za analize dobili dva vzorca blata, ki sta bila odvzeta pred prvo aplikacijo antibiotika in probiotičnega pripravka oz. placebo (začetni vzorec) ter po zadnjem odmerku antibiotika in probiotika oz. placebo (končni vzorec). Rezultati, ki smo jih dobili s štetjem na ploščah, so prikazani v preglednicah 6–8.

V naslednjem koraku smo pri vsakem posamezniku izračunali razliko med začetnim in končnim vzorcem ter iz teh vrednosti izračunali povprečno vrednost in standardni odklon, za testno in kontrolno skupino. Ti dve skupini smo statistično primerjali in naredili sklep na celotno populacijo. Zanimalo nas je, ali se populacija iz kontrolne skupine (placebo) in populacija iz testne skupine (probiotični pripravek) med seboj razlikujeta (ali so med njima statistično značilne razlike).

H₀: povprečno število mikrorganizmov v blatu za populacijo, ki uživa antibiotike in placebo, je enaka povprečnemu številu mikroorganizmov v blatu populacije, ki uživa antibiotike in probiotični pripravek.

H₁: povprečno število mikrorganizmov v blatu za populacijo, ki uživa antibiotike in placebo, ni enako povprečnemu številu mikroorganizmov v blatu populacije, ki uživa antibiotike in probiotični pripravek.

Najprej smo naredili F-test, da smo ugotovili, ali imata oba vzorca enaki varianci.

Za testiranje hipotez smo izbrali Studentov t-test, ki je najpogostejsa metoda, če imamo podano velikost vzorcev, povprečje in standardno deviacijo ob pogoju, da verjetnostna

porazdelitev vzorcev sledi Gaussovi krivulji. Naprej smo izračunali vzorčno statistiko t po sledeči formuli:

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S_{x_1 x_2} \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \dots(3)$$

$$S_{x_1 x_2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times S_{x_1}^2 + (n_2 - 1) \times S_{x_2}^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad \dots(4)$$

Pomen simbolov:

- indeks 1 je probiotični pripravek in indeks 2 placebo,
- \bar{x}_i ... povprečna vrednost i-tega vzorca,
- n_i ... velikost i-tega vzorca,
- S_{x_i} ... standardni odklon verjetnostne porazdelitve i-tega vzorca.

Standardni odklon smo izračunali po sledeči formuli (Košmelj, 2001):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \dots(5)$$

Legenda:

s ... standardni odklon

N ... število vzorcev

x_i ... posamezni vzorec

\bar{x} ... povprečna vrednost

3.4 MOLEKULARNE ANALIZE

3.4.1 Priprava vzorca za molekularne analize

Po 1 ml primarne razredčitve (10^{-2}) vzorca blata, pripravljenega, kakor je opisano zgoraj (3.4.1), smo centrifugirali (12000 x g/5 min/10 °C) v epruvetah ependorf (1,5 ml). Supernatant smo zavrgli, usedlino pa smo 2 x sprali z 1 ml 1 x PBS in ponovno centrifugirali ter zavrgli supernatant. Epruvete z usedlino smo zamrznili na -20 °C. Vsak vzorec smo pripravili v dveh paralelkah. Dobljeno usedlino smo lizirali in sonicirali, nato pa izolirali skupno DNA s sistemom Maxwell 16 Tissue Purification Kit (Promega), po navodilih proizvajalca.

3.4.1.1 Liza celic

Usedlini smo dodali:

- 400 µl pufra TE,
- 100 µl mešanice lizocima (Sigma) in mutanolizina (Sigma), tako da je bila končna koncentracija v suspenziji 5 mg/ml lizocima in 5 U/ml mutanolizina.

Inkubirali smo 2 uri pri 37 °C.

3.4.1.2 Soniciranje

Za razbijanje bakterijskih celic smo uporabili tudi sonikator (MSE UK Ltd, Soniprep 150).

Potek:

- kovinsko sondno smo privili na sonikator,
- čašo z ledom smo postavili na podstavek,
- epruveto ependorf z vzorcem smo odprli, vstavili v držalo in jo potisnili navzgor, tako da je sonda segala do sredine vzorca,
- podstavek s čašo smo dvignili, da je bila epruveta v stiku z ledom,
- soniciranje je potekalo v treh ciklih: 30 sekund delovanja in 15 sekund odmora.

Po obdelavi vsakega vzorca smo sondno obrisali s papirnato brisačo, namočeno v 70-odstotni alkohol, da smo preprečili kontaminacijo.

3.4.1.3 Izolacija DNA iz vzorcev

Iz celičnega lizata smo izolirali skupno DNA s sistemom Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega) z uporabo aparata MaxwellTM 16, po navodilih proizvajalca. Pridobili smo DNA, raztopljeno v 300 µl elucijskega pufra. Inhibitorje smo odstranili s pomočjo kolon Zymo-Spin (Zymo Research).

3.4.1.4 Kvantifikacija bifidobakterij s PCR v realnem času

3.4.1.4.1 Priprava standardne krivulje

Standardno DNA smo pridobili tako, da smo 1 ml 18-urne kulture seva *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 centrifugirali (3500 g, 10 minut), sprali s fiziološko raztopino, ponovno centrifugirali pri istem številu obratov ter usedlini dodali 1 ml 1:100 razredčene raztopine blata v anaerobnem diluentu, ki smo ga predhodno dvakrat zapored avtoklavirali. Mešanico smo centrifugirali (3500 g, 10 minut) in nato iz usedline izolirali DNA, kot je opisano zgoraj (3.5.1.2–3.5.1.4). Ustrezno redčitev kulture *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 smo v dveh ponovitvah tudi nacepili na gojišče MRS s cisteinom, da smo pridobili podatke o številu KE/ml.

Standardno krivuljo smo pripravili iz dvakratnih zaporednih razredčitev vzorcev standardne DNA seva *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, ki smo jih uporabili v reakciji PCR v realnem času, kar bo opisano v nadaljevanju.

3.4.1.4.2 Reakcija PCR v realnem času

Za vsako reakcijo smo pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo razdelili v luknjice mikrotiterske plošče, po 20 µl v vsako luknjico. Pred reakcijo smo v vsako luknjico dodali še 5 µl 100-krat redčene DNA. Reakcijska mešanica (25 µl) za PCR v realnem času končnega volumna 25 µl je vsebovala:

- 0,05 µl začetnega oligonukleotida Bif-F (100 µM),
- 0,05 µl začetnega oligonukleotida Bif-R (100 µM),
- 12,5 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen),
- 7,4 µl sterilizirane mikrofiltrirane vode,
- 5 µl DNA.

Uporabili smo začetna oligonukleotida Bif-F in Bif-R, specifična za rod *Bifidobacterium*, ki so ju skonstruirali in preskusili Rintilla in sod. (2004).

Mikrotitrsko ploščo z vnešenimi standardnimi vzorci in vzorci DNA iz izdelka, vsak standardni vzorec in vsak vzorec v paralelkah smo prenesli v aparat MX3000P (Stratagene, La Jolla, Calif.). Pomnoževanje je potekalo po naslednjem temperaturno-časovnem protokolu:

- 50 °C za 2 minuti in 95 °C za 10 minut (začetna denaturacija DNA),
- 35 ciklov:
 - 95 °C za 15 sekund (denaturacija DNA),
 - 59 °C za 15 sekund (prileganje začetnih oligonukleotidov),
 - 72 °C za 30 sekund (podaljševanje verige).

3.4.1.4.3 Preverjanje specifičnosti pomnoževanja

Po 35 ciklih pomnoževanja smo izvedli disociacijsko analizo pomnožkov v reakciji PCR, po vgrajenem protokolu proizvajalca. Če je na disociacijski krivulji vidnih več vrhov, pomeni, da reakcija ni bila dovolj specifična, saj smo dobili pomnožke različnih velikosti oz. sestave.

Med reakcijo PCR se avtomatično beležijo izmerjene vrednosti intenzitete fluorescence ter se preračunajo s programom MxPro™ QPCR Software (Stratagene). Program samodejno izriše tudi standardno krivuljo, ki kaže korelacijo med vrednostmi Ct in številom bakterij v izhodiščnem vzorcu (CFU/g). Vrednosti Ct povedo število ciklov, pri katerem je mejna vrednost fluorescence presežena. Po obdelavi podatkov odčitamo vrednosti Ct, naklon in prileganje standardne krivulje, učinkovitost reakcije ter koncentracije bakterij v vzorcih.

Koncentracije bakterij preračunamo na g izhodiščnega vzorca blata tako, da množimo s 10000, ker smo blato in DNA redčili 100-krat.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH ANALIZ S ŠTETJEM NA PLOŠČAH

V preglednicah 6, 7 in 8 so rezultati štetja bakterijskih skupin v blatu na ustreznih selektivnih gojiščih. Pri nekaterih vzorcih so bili rezultati štetja pod mejo detekcije, ki je bila 10000 KE/g. Ta problem smo rešili tako, da smo pred statistično analizo rezultatu bodisi pripisali vrednost 9000 bodisi jih izpustili. T-test smo opravili za obe možnosti, vendar v nobenem primeru nismo ugotovili statistično značilnih razlik med skupinami.

Preglednica 6: Rezultati štetja na ploščah (KE/g) za bifidobakterije in laktobacile v blatu

Št. vzorca	Testna skupina	<i>Bifidobacterium</i>		<i>Lactobacillus</i>	
		Začetni	Končni	Začetni	Končni
111	probiotični pripravek	1,15E+08	6,75E+05	4,65E+08	2,95E+05
112	probiotični pripravek	< 10000	1,35E+05	< 10000	2,39E+05
114	probiotični pripravek	3,05E+07	3,14E+08	4,10E+08	2,80E+05
115	placebo	2,50E+06	1,19E+07	5,70E+05	2,64E+07
116	probiotični pripravek	2,45E+06	9,90E+06	1,40E+07	1,21E+07
117	probiotični pripravek	3,26E+05	3,50E+04	4,95E+05	5,20E+04
118	placebo	1,70E+04	1,77E+04	1,12E+05	5,20E+06
119	probiotični pripravek	3,80E+07	7,90E+05	1,54E+09	1,13E+08
120	placebo	2,75E+04	1,50E+05	6,00E+04	9,47E+05
121	placebo	2,00E+07	1,62E+07	8,97E+06	1,85E+08
122	probiotični pripravek	4,90E+05	9,30E+06	9,45E+05	1,14E+07
123	probiotični pripravek	1,74E+05	1,17E+07	2,54E+07	5,45E+07
124	placebo	7,05E+05	1,33E+06	7,30E+06	1,64E+06
125	placebo	6,05E+04	1,21E+06	6,20E+04	1,40E+04
126	placebo	8,90E+06	2,45E+04	3,10E+08	1,84E+06
128	placebo	< 10000	1,14E+06	1,23E+06	6,55E+05
129	probiotični pripravek	< 10000	4,75E+03	3,90E+05	< 10000

Preglednica 7: Rezultati štetja na ploščah (KE/g) za stafilokoke in enterokoke v blatu

Št. vzorca	Testna skupina	<i>Staphylococcus</i>		<i>Enterococcus</i>	
		Začetni	Končni	Začetni	Končni
111	probiotični pripravek	< 10000	< 10000	3,45E+05	< 10000
112	probiotični pripravek	< 10000	< 10000	< 10000	1,80E+05
114	probiotični pripravek	< 10000	< 10000	2,16E+04	< 10000
115	placebo	1,00E+04	2,70E+04	< 10000	5,95E+04
116	probiotični pripravek	< 10000	7,35E+04	7,70E+04	3,50E+05
117	probiotični pripravek	2,24E+05	1,35E+04	2,50E+05	3,70E+04
118	placebo	< 10000	< 10000	1,10E+04	3,30E+05
119	probiotični pripravek	1,70E+06	1,27E+06	3,30E+06	3,75E+07
120	placebo	3,80E+04	< 10000	1,28E+04	2,31E+04
121	placebo	< 10000	< 10000	7,60E+05	3,05E+05
122	probiotični pripravek	< 10000	< 10000	1,55E+04	1,06E+05
123	probiotični pripravek	2,15E+06	< 10000	2,35E+05	2,22E+06
124	placebo	< 10000	< 10000	< 10000	3,00E+04
125	placebo	3,10E+04	< 10000	4,00E+04	5,15E+05
126	placebo	7,45E+04	5,85E+05	< 10000	3,17E+07
128	placebo	7,10E+04	1,78E+05	1,38E+05	2,35E+05
129	probiotični pripravek	< 10000	< 10000	< 10000	< 10000

Preglednica 8: Rezultati štetja na ploščah (KE/g) za enterobakterije in kvasovke v blatu

Št. vzorca	Testna skupina	Enterobacteriaceae		kvasovke	
		Začetni	Končni	Začetni	Končni
111	probiotični pripravek	< 10000	< 10000	< 10000	< 10000
112	probiotični pripravek	< 10000	2,45E+04	< 10000	1,80E+04
114	probiotični pripravek	4,88E+05	< 10000	< 10000	3,30E+05
115	placebo	2,16E+07	1,10E+06	< 10000	< 10000
116	probiotični pripravek	2,43E+05	< 10000	1,75E+04	3,30E+04
117	probiotični pripravek	2,26E+06	< 10000	< 10000	4,05E+05
118	placebo	< 10000	1,50E+04	< 10000	5,20E+05
119	probiotični pripravek	1,60E+06	< 10000	7,90E+04	1,03E+06
120	placebo	3,30E+04	< 10000	< 10000	< 10000
121	placebo	1,05E+04	< 10000	6,35E+04	< 10000
122	probiotični pripravek	7,45E+06	9,05E+04	< 10000	< 10000
123	probiotični pripravek	2,08E+06	9,95E+06	3,05E+04	2,42E+05
124	placebo	< 10000	< 10000	< 10000	< 10000
125	placebo	2,58E+05	1,15E+05	2,00E+04	3,95E+04
126	placebo	2,25E+04	< 10000	< 10000	3,25E+04
128	placebo	< 10000	4,85E+04	< 10000	< 10000
129	probiotični pripravek	4,80E+05	< 10000	< 10000	< 10000

V Preglednici 9 so prikazane povprečne vrednosti štetja izbranih skupin bakterij v blatu 17 preiskovancev, od katerih jih je devet iz testne skupine (probiotični pripravek) in osem iz kontrolne skupine (placebo). Polovica vzorcev je bila odvzeta pred začetkom zdravljenja (Z), polovica pa po končanem uživanju probiotičnega pripravka/placeba (K).

Preglednica 9: Povprečne vrednosti štetja različnih skupin bakterij v blatu preiskovancev. Rezultatom pod mejo detekcije (10000) smo pripisali vrednost 9000.

Vrsta bakterij	Probiotični pripravek		Placebo	
	Z; KE/g	K; KE/g	Z; KE/g	K; KE/g
<i>Bifidobacterium</i>	$2,1 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
<i>Lactobacillus</i>	$2,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7$
<i>Enterococcus</i>	$4,7 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^6$
<i>Staphylococcus</i>	$4,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
Enterobacteriaceae	$1,6 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$
kvasovke	$2,0 \times 10^4$	$2,3 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$

Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov

K.....po končanem jemanju antibiotikov

Preglednica 10: Logaritemske povprečne vrednosti štetja različnih skupin bakterij v blatu preiskovancev. Rezultatom pod mejo detekcije smo pripisali vrednost 9000.

Vrsta bakterij	Probiotični pripravek		Placebo	
	Z; \log_{10} KE/g	K; \log_{10} KE/g	Z; \log_{10} KE/g	K; \log_{10} KE/g
<i>Bifidobacterium</i>	6,4	6,1	5,5	5,8
<i>Lactobacillus</i>	6,9	6,1	6,1	6,4
<i>Enterococcus</i>	5,0	5,2	4,5	5,4
<i>Staphylococcus</i>	4,7	4,3	4,3	4,4
Enterobacteriaceae	5,6	4,5	4,7	4,5
kvasovke	4,2	4,8	4,1	4,4

Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov

K.....po končanem jemanju antibiotikov

Preglednica 11: Standardni odkloni štetja različnih skupin bakterij v blatu preiskovancev. Rezultatom pod mejo detekcije smo pripisali vrednost 9000.

Vrsta bakterij	Probiotični pripravek		Placebo	
	Z; \log_{10} KE/g	K; \log_{10} KE/g	Z; \log_{10} KE/g	K; \log_{10} KE/g
<i>Bifidobacterium</i>	1,3	1,5	1,3	1,1
<i>Lactobacillus</i>	1,7	1,4	1,3	1,2
<i>Enterococcus</i>	0,8	1,2	0,7	1,0
<i>Staphylococcus</i>	1,0	0,7	0,4	0,7
Enterobacteriaceae	1,0	1,0	1,2	0,8
kvasovke	0,3	0,8	0,3	0,6

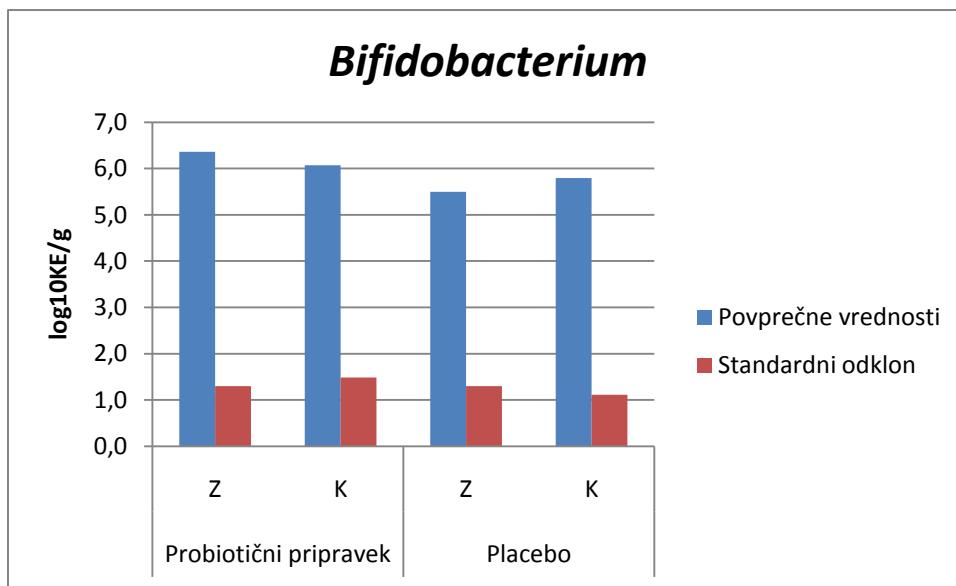
Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov

K.....po končanem jemanju antibiotikov

4.1.1 Grafični prikaz sestave mikrobne populacije v kontrolni ter testni skupini, pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki

Slike 7–12 kažejo rezultate štetja posameznih skupin bakterij v blatu posameznikov iz testne ali kontrolne skupine. Vzorci blata so bili odvzeti pred začetkom zdravljenja z antibiotiki (Z) ali po končanem uživanju antibiotikov in probiotikov oz. placebo (K).

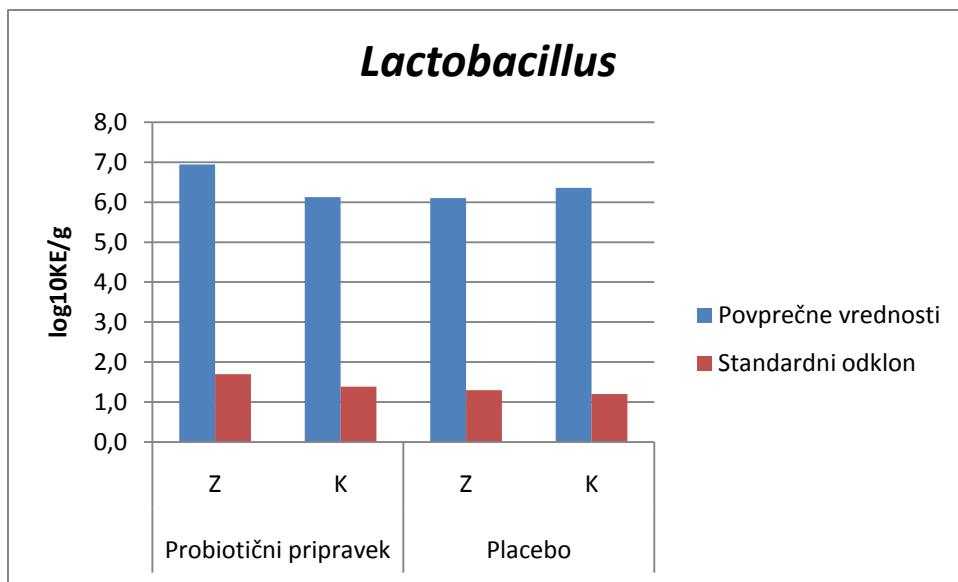


Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov in probiotikov/placeba

K.....po končanem jemanju antibiotikov in probiotikov/placeba

Slika 6: Povprečne vrednosti (\log_{10} KE/g) in standardni odkloni štetja bakterij rodu *Bifidobacterium* v blatu preiskovancev

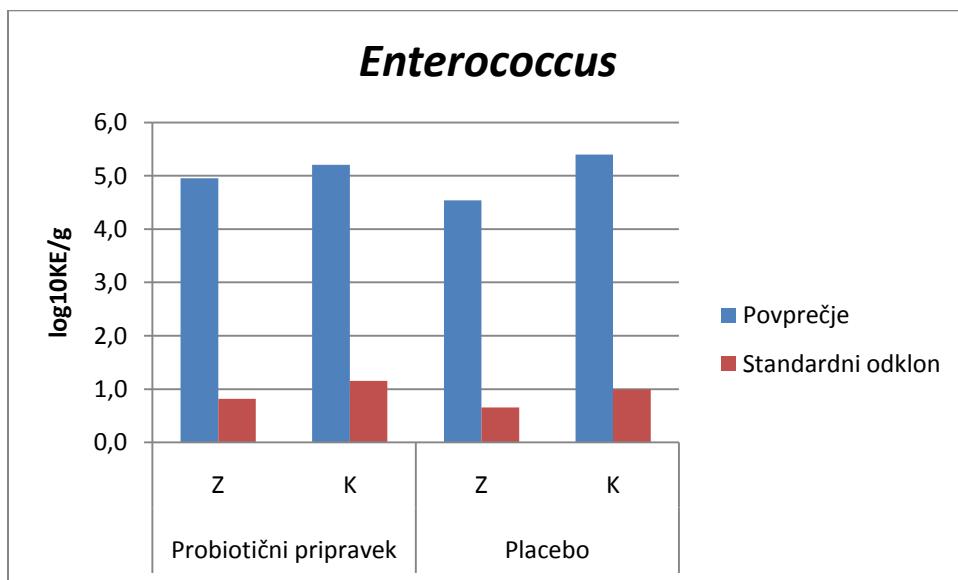


Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov in probiotikov/placeba

K.....po končanem jemanju antibiotikov in probiotikov/placeba

Slika 7: Povprečne vrednosti ($\log_{10}KE/g$) in standardni odkloni štetja bakterij rodu *Lactobacillus* v blatu preiskovancev

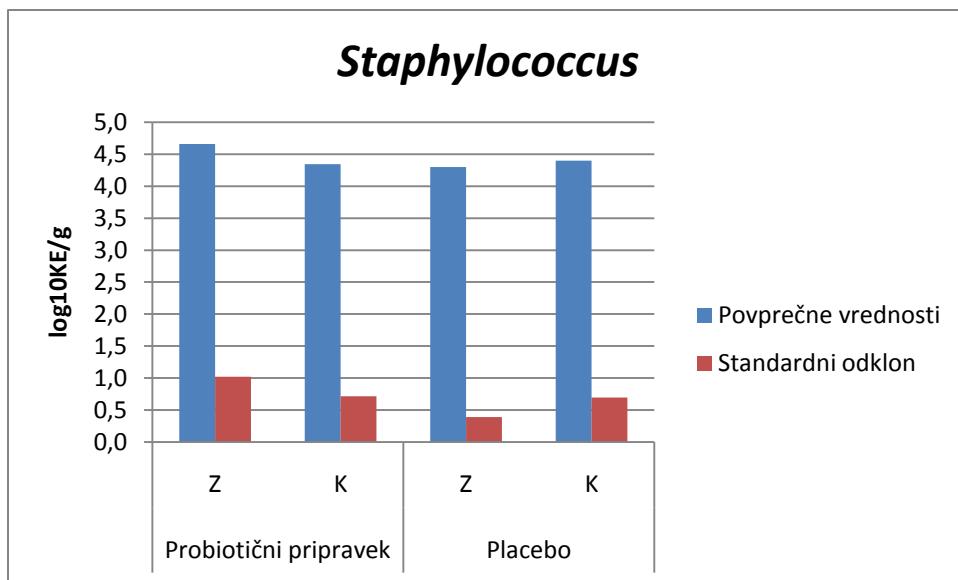


Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov in probiotikov/placeba

K.....po končanem jemanju antibiotikov in probiotikov/placeba

Slika 8: Povprečne vrednosti ($\log_{10}KE/g$) in standardni odkloni štetja bakterij rodu *Enterococcus* v blatu preiskovancev

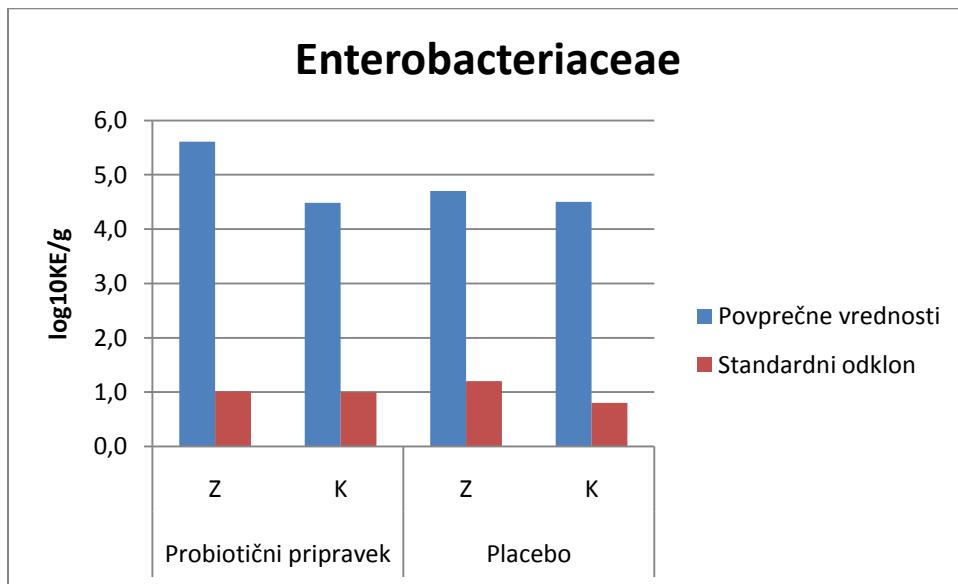


Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov in probiotikov/placeba

K.....po končanem jemanju antibiotikov in probiotikov/placeba

Slika 9: Povprečne vrednosti ($\log_{10}KE/g$) in standardni odkloni štetja bakterij rodu *Staphylococcus* v blatu preiskovancev

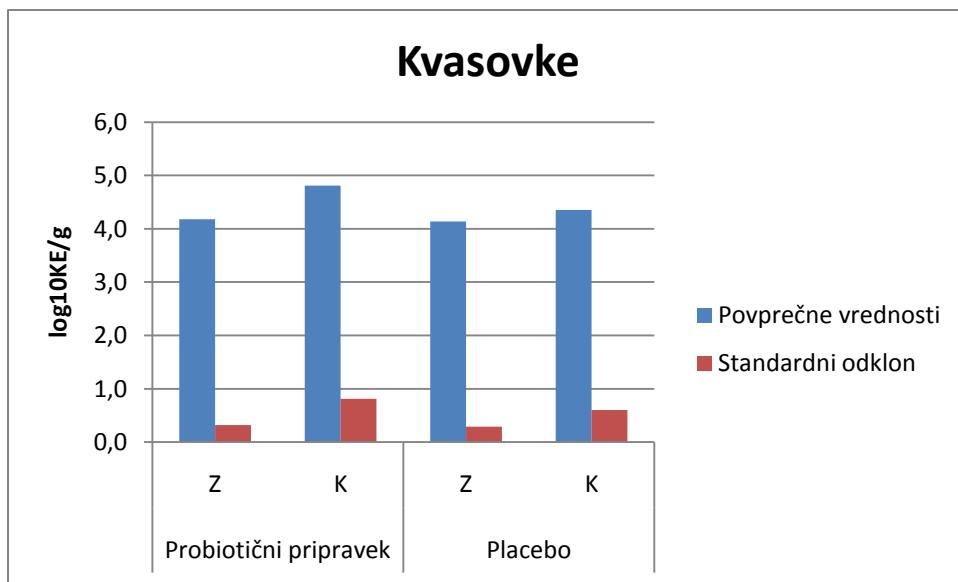


Legenda:

Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov in probiotikov/placeba

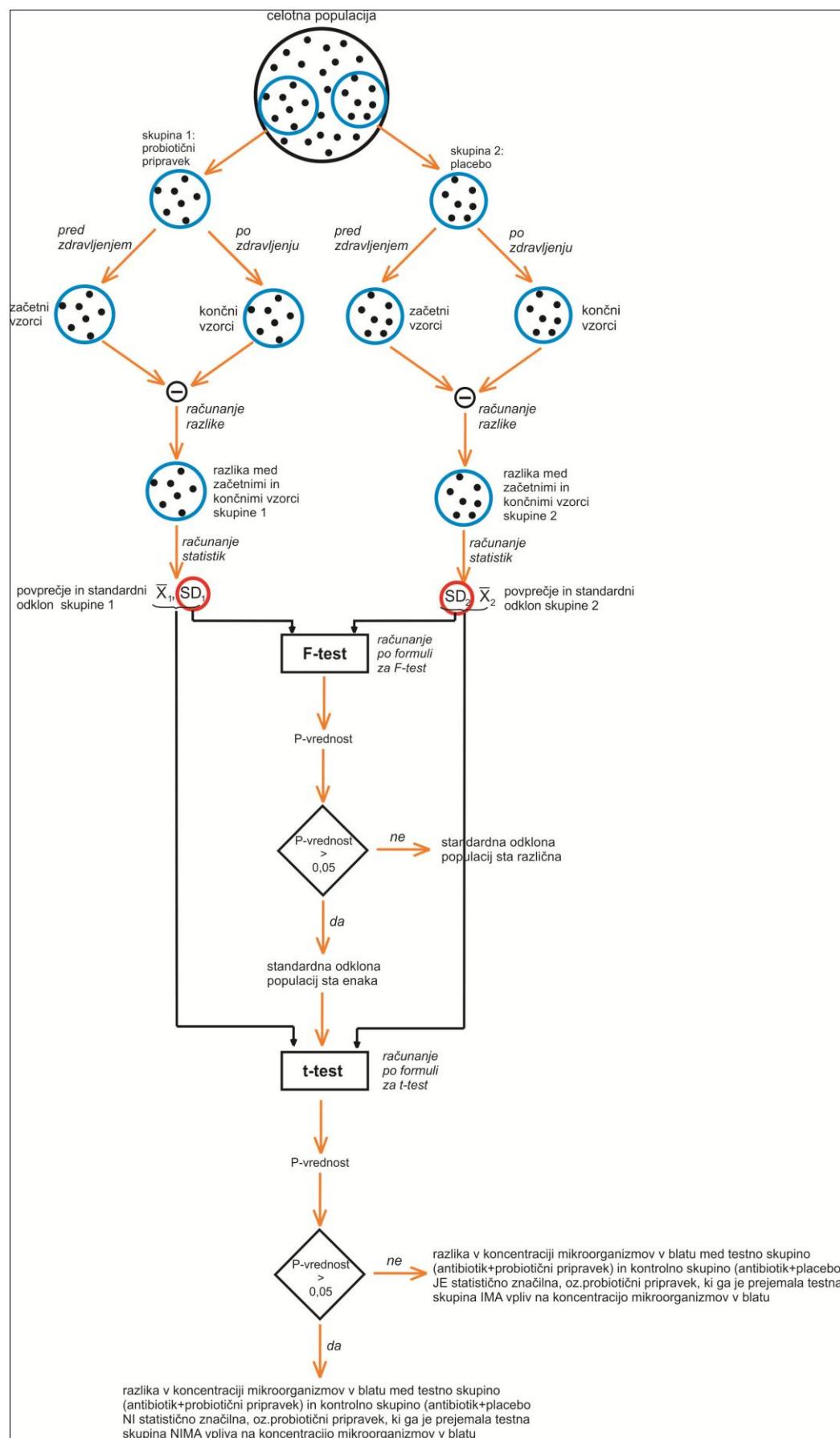
K.....po končanem jemanju antibiotikov in probiotikov/placeba

Slika 10: Povprečne vrednosti ($\log_{10}KE/g$) in standardni odkloni štetja bakterij družine Enterobacteriaceae v blatu preiskovancev



Legenda:
Z.....pred začetkom jemanja antibiotikov in probiotikov/placebo
K.....po končanem jemanju antibiotikov in probiotikov/placebo

Slika 11: Povprečne vrednosti ($\log_{10}\text{KE/g}$) in standardni odkloni štetja kvasovk v blatu preiskovancev



Slika 12: Prikaz statistične obdelave rezultatov

Na Sliki 12 je prikazan potek statistične obdelave rezultatov, ki smo jih zajeli v naši raziskavi. Med celotno populacijo smo izbrali 17 posameznikov in jih razdelili v dve skupini. Devet jih je pripadalo testni skupini (antibiotik + probiotični pripravek), osem pa kontrolni skupini (antibiotik + placebo). Od vsakega posameznika smo za analize dobili dva vzorca blata, ki sta bila odvzeta pred prvo aplikacijo antibiotika in probiotičnega pripravka oz. placebo (začetni vzorec) ter po zadnjem odmerku antibiotika in probiotika oz. placebo (končni vzorec). Rezultati, ki smo jih dobili s štetjem na ploščah, so prikazani v preglednicah 6–8.

V naslednjem koraku smo pri vsakem posamezniku izračunali razliko med začetnim in končnim vzorcem ter iz teh vrednosti izračunali povprečno vrednost in standardni odklon, za testno in kontrolno skupino. Sedaj lahko ti dve skupini statistično primerjamo in naredimo sklep na celotno populacijo. Najprej izračunamo F-test, ki nam pove, ali sta standardna odklona različna ali ne (v našem primeru sta), nato pa s t-testom dobimo rezultat, P-vrednost, ki je izračunana na osnovi velikosti obeh skupin, povprečnih vrednostih vzorcev in standardnih odklonov. Če je P-vrednost večja od običajne verjetnosti zaupanja $\alpha = 0,05$, potem sprejmemo hipotezo H_0 , da sta povprečji populacij testne in kontrolne skupine enaki. Če je P-vrednost manjša od $\alpha = 0,05$, hipotezo zavrnemo oz. sta povprečji populacij različni. To naredimo za vsako skupino mikroorganizmov, kot kaže Preglednica 12.

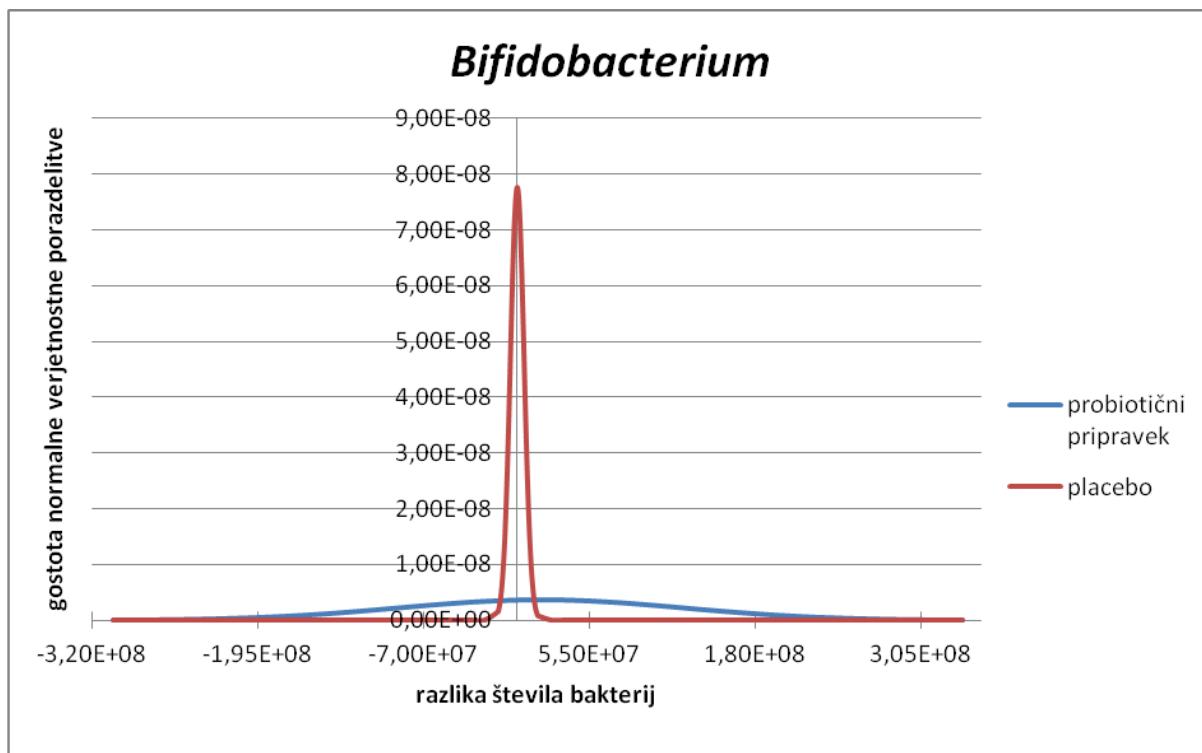
Preglednica 12: Rezultati statističnega testiranja povprečja razlik (med začetnimi in končnimi vzorci) za kontrolno in testno skupino

Vrsta mikroorganizma	Testna skupina	Velikost	F-test		t-test	
			F-vrednost	P-vrednost	t-vrednost	P-vrednost
<i>Bifidobacterium</i>	probiotik	9	3,256	0,091	0,466	0,648
	placebo	8				
<i>Lactobacillus</i>	probiotik	9	5,323	0,036	-1,351	0,197
	placebo	8				
<i>Enterococcus</i>	probiotik	9	0,02	0,961	-0,02	0,999
	placebo	8				
<i>Staphylococcus</i>	probiotik	9	2,7	0,121	-1,452	0,167
	placebo	8				
Enterobacteriaceae	probiotik	9	1,197	0,291	0,75	0,465
	placebo	8				
kvasovke	probiotik	9	1,885	1,9	1,165	0,262
	placebo	8				
PCR v realnem času za <i>Bifidobacterium</i>	probiotik	7	1,425	0,678	1,323	0,21
	placebo	7				

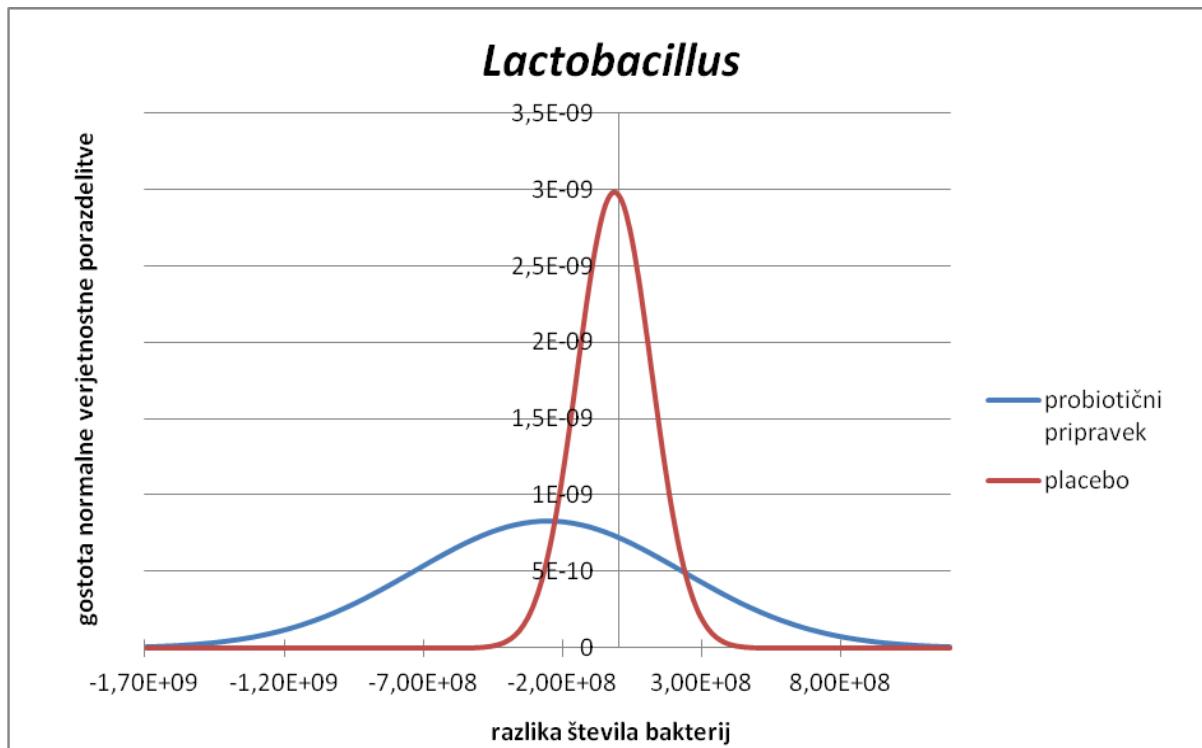
Preglednica 12 kaže statistične izračune za F- in t-test.

4.1.2 Grafični prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike koncentracije bakterij pred in po zdravljenju, v testni in kontrolni skupini

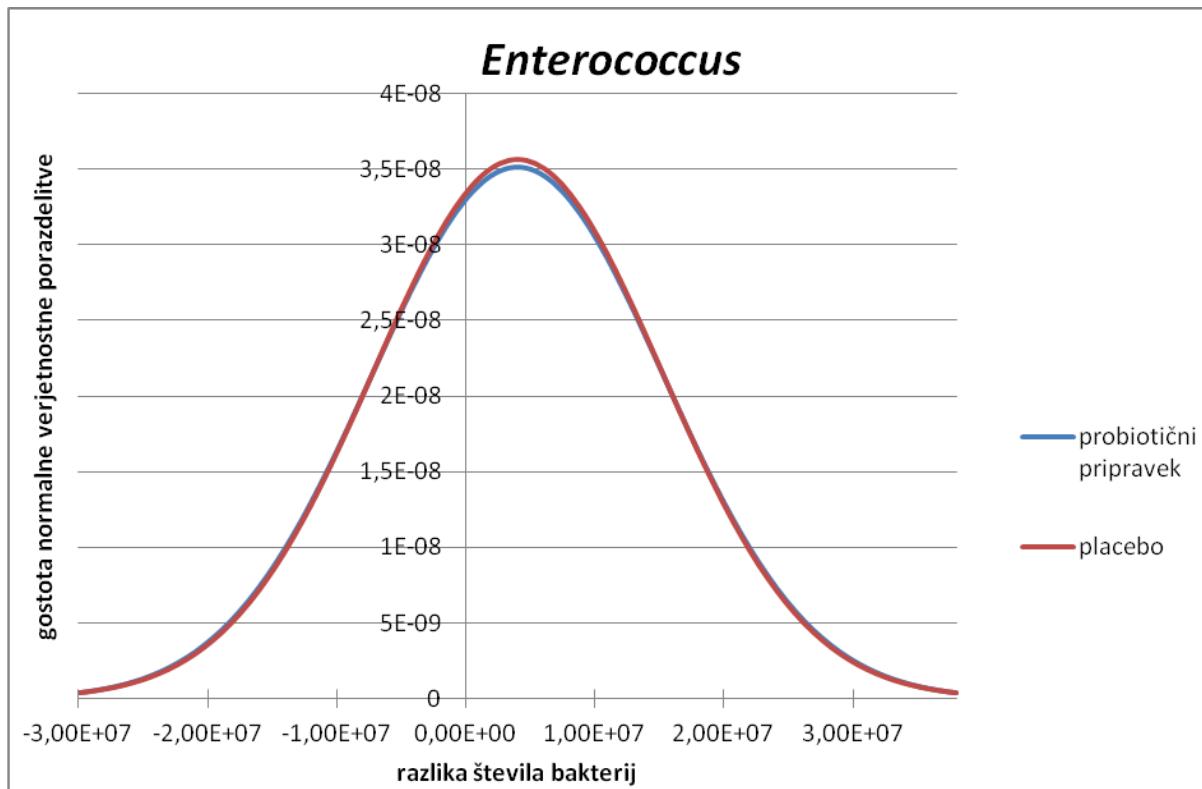
Razlika števila (pred začetkom in po koncu zdravljenja) mikroorganizmov v testni in kontrolni skupini se porazdeljuje normalno, saj je splošna populacija, iz katere smo vzeli skupino ljudi za testiranje, prav tako normalno porazdeljena. Ko opazujemo grafe gostotne funkcije, se sprašujemo, kakšna je verjetnost, da bo v nekem poskusu vrednost razlike mikroorganizmov v želenem intervalu. To verjetnost dobimo tako, da izračunamo ploščino grafa na tem intervalu.



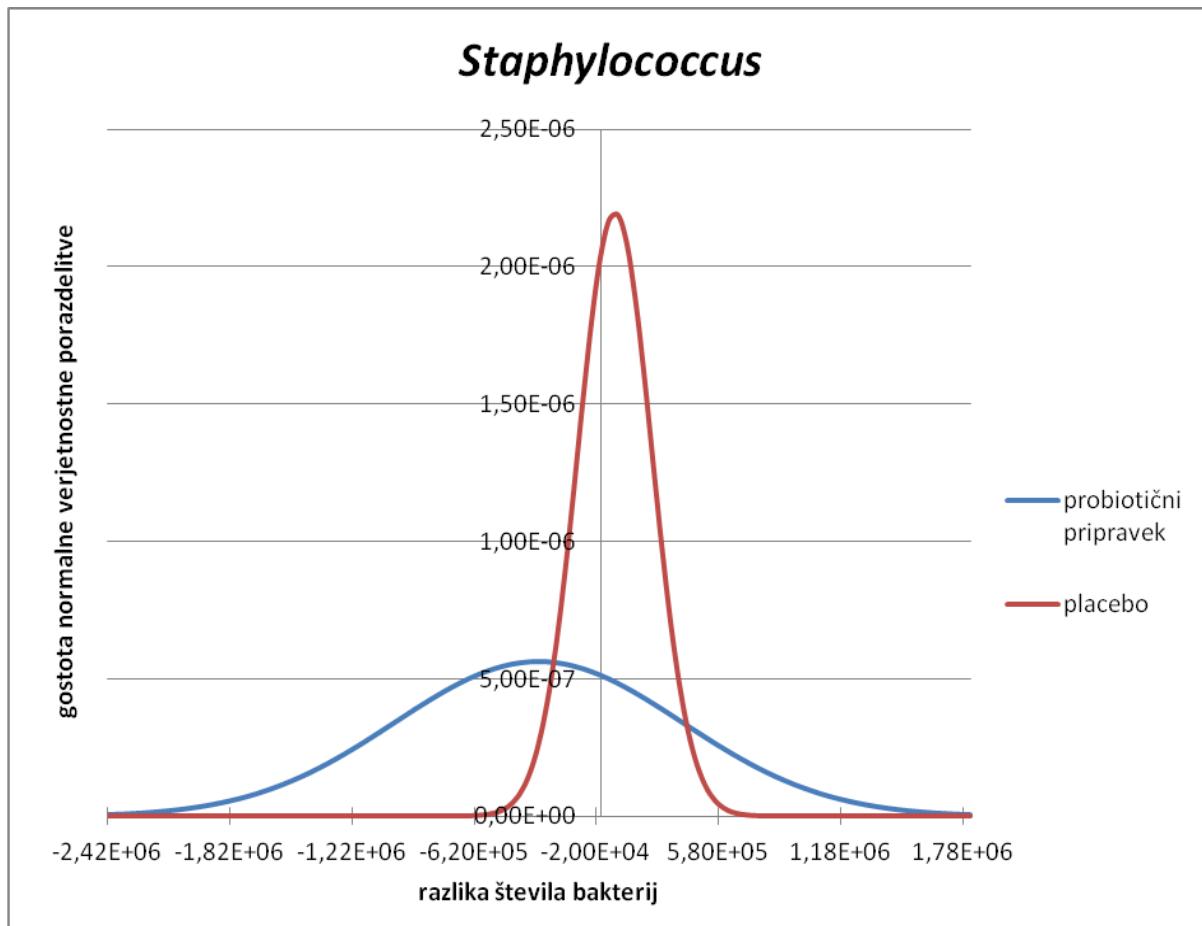
Slika 13: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu *Bifidobacterium* pred in po tretiraju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini



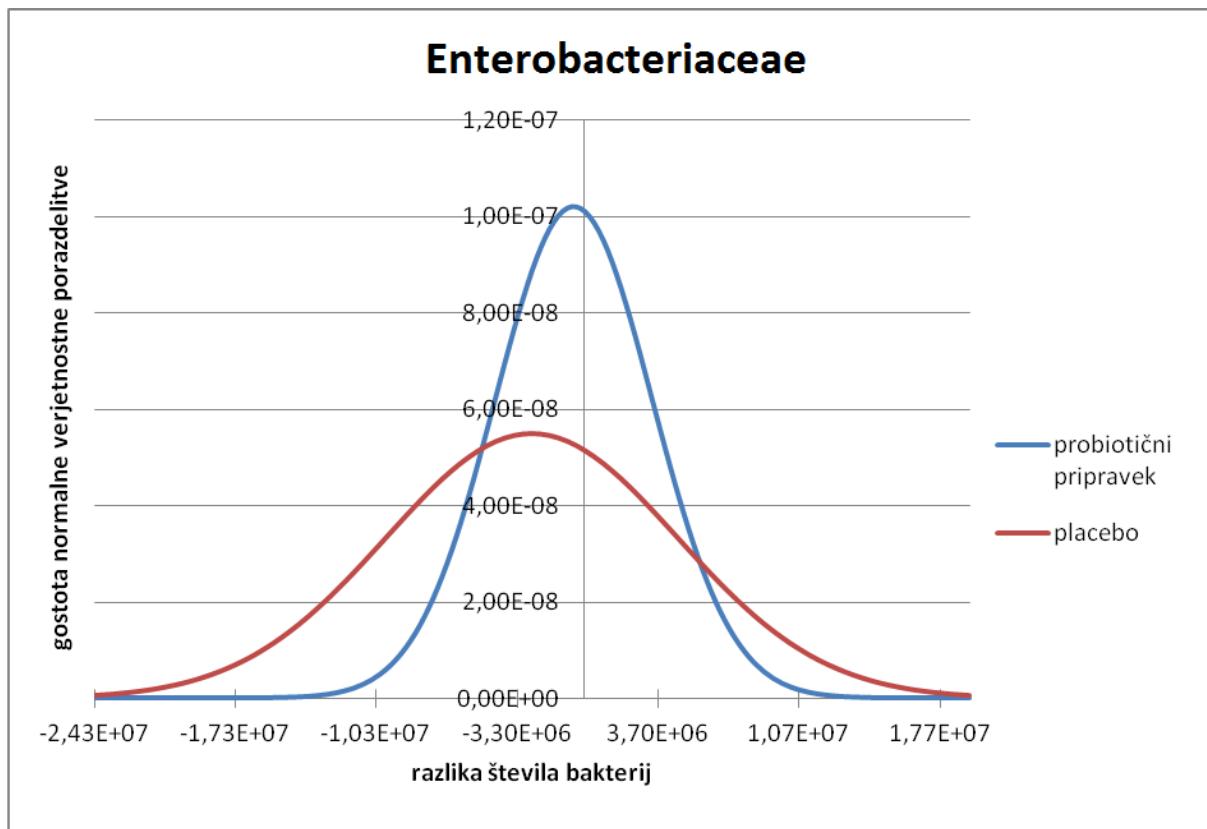
Slika 14: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu *Lactobacillus* pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini



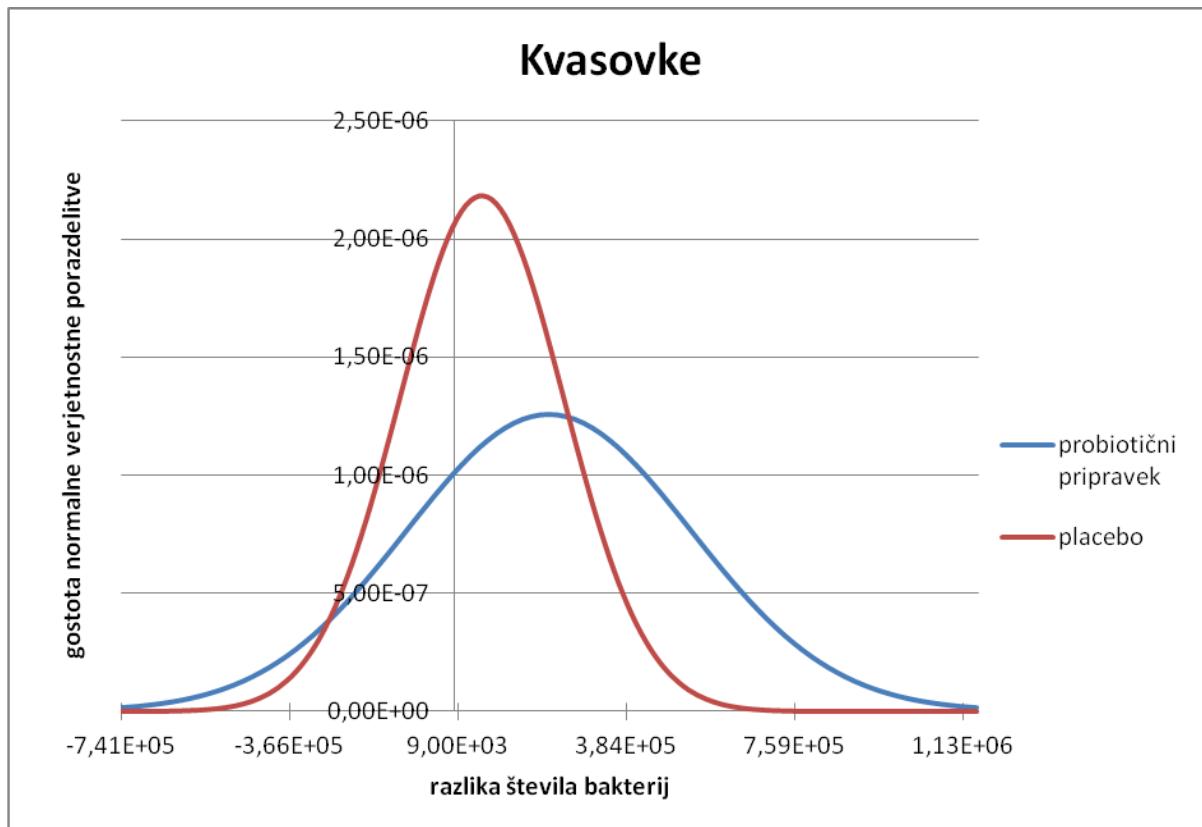
Slika 15: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu *Enterococcus* pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini



Slika 16: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu *Staphylococcus* pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini



Slika 17: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu Enterobacteriaceae pred in po tretiranju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini

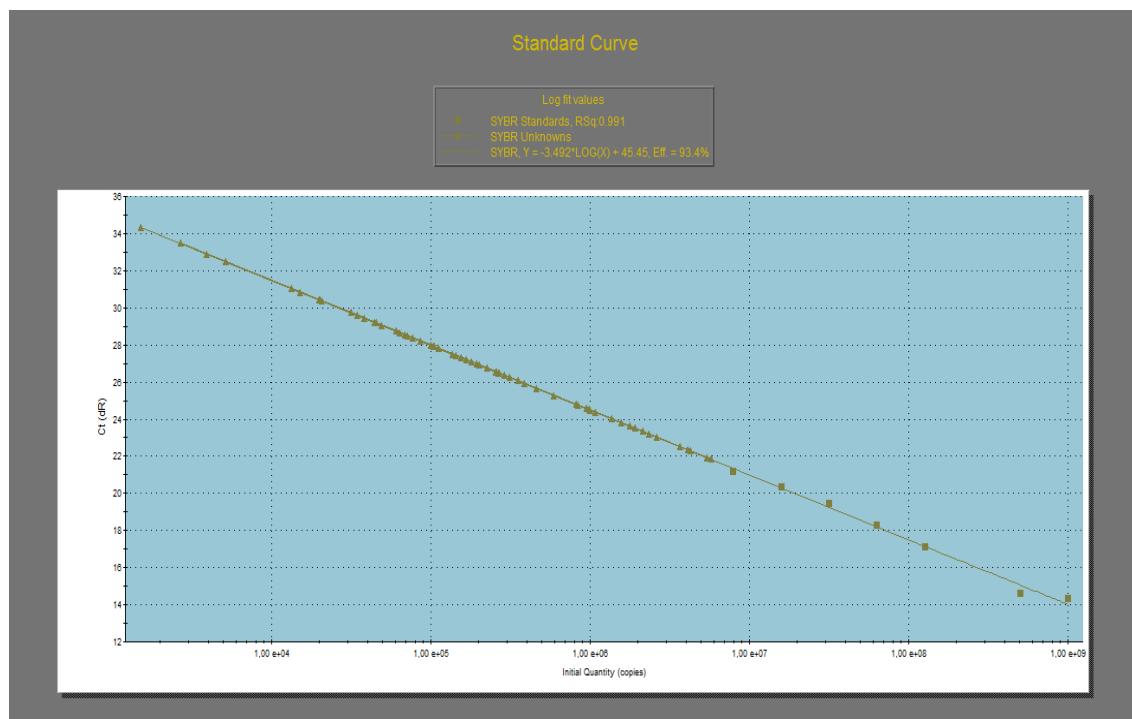


Slika 18: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila kvasovk pred in po tretiraju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini

4.2 REZULTATI UGOTAVLJANJA BIFIDOBakterij V BLATU S PCR V REALNEM ČASU

Standardne vzorce smo pripravili iz bakterijskega seva *B. animalis* ssp. *lactis* Bb-12. Ker smo kulturo, iz katere smo osamili DNA, predhodno nacepili na gojišče za štetje na ploščah, smo vedeli, iz koliko kolonijskih enot (KE) je bila DNA pridobljena. Podatek za število KE smo preračunali v število kopij gena za 16S rRNA tako, da smo KE pomnožili z vrednostjo 3, ker je za podvrsto *B. animalis* ssp. *lactis* znano, da praviloma vsebuje 3 kopije tega gena.

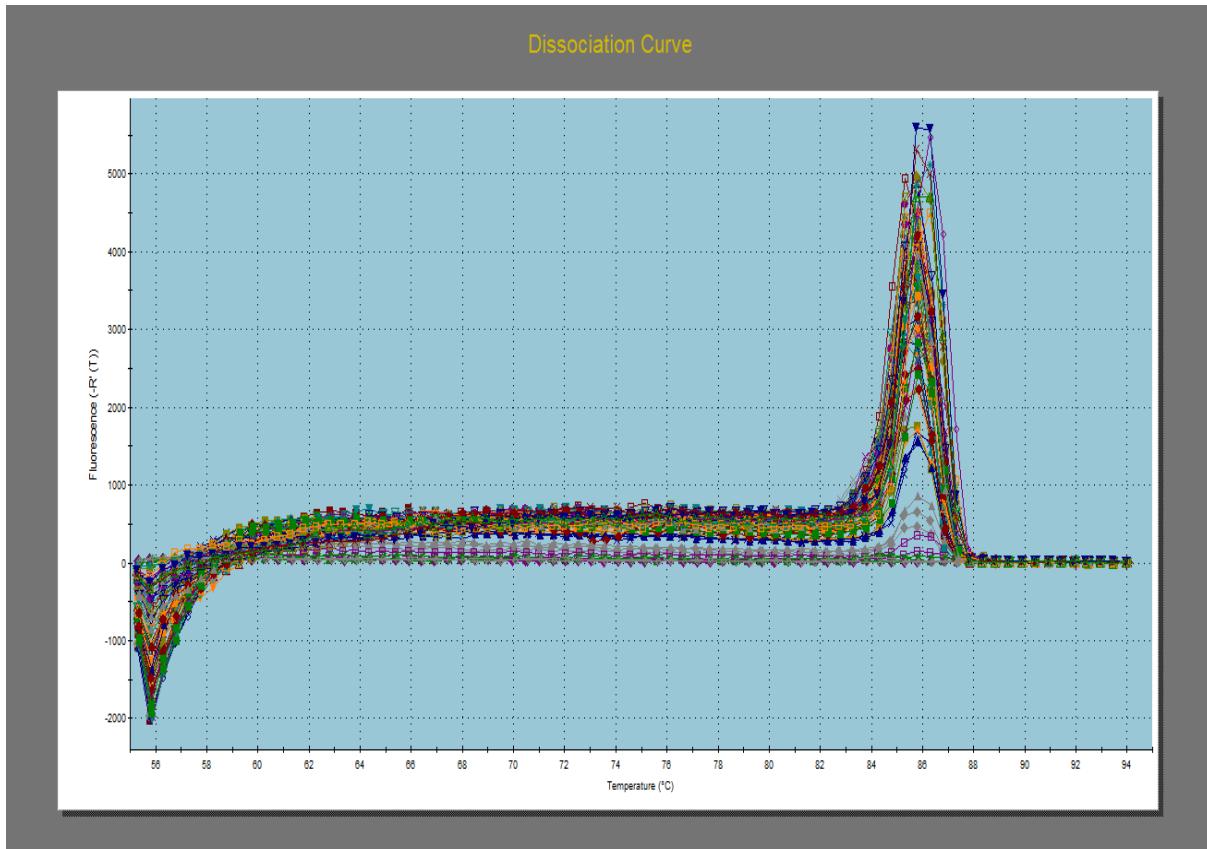
Na Sliki 19 je standardna krivulja za izračunavanje števila bakterij rodu *Bifidobacterium* iz vrednosti C_t , odčitanih pri reakciji PCR v realnem času. Na abscisni osi je prikazano število kopij gena 16S rRNA v vzorcu (standardnem ali neznanem), na ordinatni pa vrednost C_t (vrednost, ki pove število ciklov, ki so potrebni, da reakcija pomnoževanja preide v eksponentno fazo). Iz vrednosti C_t in odgovarjajočega števila kopij genov za 16S rRNA v standardnih vzorcih je bila izrisana standardna krivulja. S pomočjo te se iz izmerjenih vrednosti C_t neznanih vzorcev izračuna število kopij genov za 16S rRNA v neznanih vzorcih. Pridobljene vrednosti smo pomnožili še s faktorjem razredčevanja DNA, uporabljene v reakciji PCR, ter s faktorjem redčenja vzorca pred izolacijo DNA in tako dobili rezultat v obliki števila kopij 16S rDNA v gramu blata. Učinkovitost pomnoževanja je bila 93,4 %, kar je sprejemljivo.



Legenda:

kvadrat.....standard
trikotnik.....vzorec

Slika 19: Standardna krivulja za ugotavljanje števila bifidobakterij z metodo PCR v realnem času



Slika 20: Disociacijska krivulja pomnožkov dela gena za 16S rRNA pri bifidobakterijah pri PCR v realnem času

Specifičnost reakcije smo preverjali s disociacijsko analizo pomnožkov, ki smo jo izvedli po končanih 35 ciklih pomnoževanja, po protokolu proizvajalca aparata za PCR v realnem času in programske opreme. Med segrevanjem pride do disociacije verig DNA-pomnožkov, zaradi česar se fluorescensa zmanjša. Na abscisi je prikazana temperatura, na ordinati pa so negativne vrednosti odvoda izmerjene fluorescense. En vrh na disociacijski krivulji pove, da smo med pomnoževanjem dobili enake pomnožke oz. da je reakcija specifična. Dopustna variabilnost temperature je $+/- 1$ °C. Več vrhov bi pomenilo, da smo dobili pomnožke različnih velikosti oz. sestave.

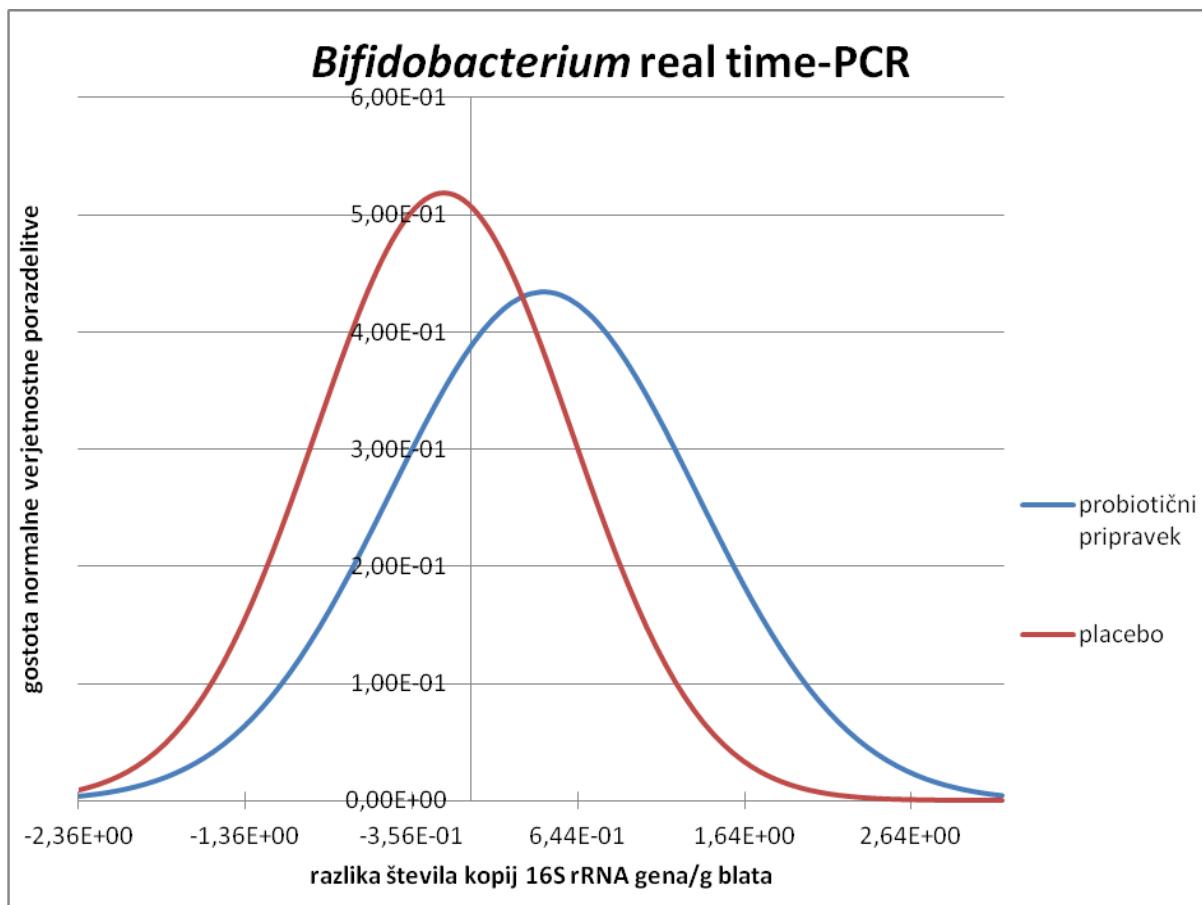
V Preglednici 13 so rezultati ugotavljanja števila bifidobakterij v blatu, izraženega z logaritmirano vrednostjo števila kopij gena za 16S rRNA/g blata.

Preglednica 13: Rezultati PCR v realnem času za bifidobakterije

	<i>Bifidobacterium</i> (logaritmirana vrednost števila kopij gena za 16S rRNA/g blata ± stand. dev.)		
Testna skupina	Št. bolnika	Začetni vzorec	Končni vzorec
probiotični pripravek	111	10,62 ± 0,341	9,75 ± 0,588
probiotični pripravek	112	7,20 ± n.p.	7,72 ± 0,109
probiotični pripravek	114	10,72 ± 0,082	10,57 ± 0,177
placebo	115	7,40 ± 1,423	9,34 ± 0,110
probiotični pripravek	116	8,39 ± 0,119	9,54 ± 0,032
placebo	118	9,10 ± 0,438	8,97 ± 0,070
probiotični pripravek	119	n.p.	8,62 ± 0,178
placebo	120	8,96 ± 0,044	9,86 ± 0,476
placebo	121	9,66 ± 0,412	10,28 ± 0,097
probiotični pripravek	122	10,06 ± 0,009	9,83 ± 0,334
probiotični pripravek	123	10,43 ± 0,059	9,46 ± 0,116
placebo	124	8,41 ± 0,078	8,73 ± 0,106
placebo	125	n. p.	n. p.
placebo	126	10,41 ± 0,439	9,36 ± 0,327
placebo	128	9,16 ± 0,022	9,59 ± 0,154
probiotični pripravek	129	9,97 ± 0,245	9,36 ± 0,274

Legenda:

n.p.....ni podatka



Slika 21: Prikaz gostote normalne verjetnostne porazdelitve razlike števila bakterij rodu *Bifidobacterium*, določene z metodo PCR v realnem času, pred in po tretiraju z antibiotiki in probiotiki, v testni (probiotični pripravek) in kontrolni (placebo) skupini

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Koncentracijo bakterij v blatu smo ugotavliali s štetjem kolonij, ki so zrasle na selektivnih gojiščih (Preglednica 1), pri bifidobakterijah pa smo poleg tega uporabili še metodo PCR v realnem času. V našo nalogu je bilo vključenih 17 ljudi, ki so bili razdeljeni v dve skupini, testno (antibiotik in probiotični pripravek), ki je vključevala devet ljudi, in kontrolno (antibiotik in placebo), ki je vključevala osem ljudi. Vzorce smo pregledovali pred začetkom uživanja antibiotikov in po končanem uživanju probiotikov oz. placebo, ki je trajalo en teden več kot antibiotična terapija.

Pri nekaterih vzorcih je na ploščah z najnižjo razredčitvijo (10^{-3}) vzorcev blata, ki smo jo uporabili za nacepljanje, izraslo manj kot 10 kolonij, kar pomeni, da niso bile števne. Rezultati teh vzorcev so pod mejo detekcije oz. < 10000 KE/g in smo jim pripisali vrednost 9000 oz. $9,0 \times 10^3$ KE/g blata, kar je razvidno iz preglednic.

Koncentracijo bifidobakterij smo ugotavliali na selektivnem gojišču MRS z dodatkom mupirocina in cisteina (anaerobna kultivacija, $37^\circ\text{C}/48\text{--}72\text{h}$). Tudi med posamezniki istih skupin so se vrednosti močno razlikovale. Pri testni skupini (probiotični pripravek) se je koncentracija bakterij pred zdravljenjem z antibiotiki gibala od 9×10^3 do $1,2 \times 10^8$ KE/g, po zdravljenju in uživanju probiotika oz. placebo pa med $9,0 \times 10^3$ in $3,1 \times 10^8$ KE/g. Podobno je bilo tudi pri kontrolni skupini (placebo), kjer se je koncentracija v začetnih vzorcih gibala med $9,0 \times 10^3$ in $3,8 \times 10^7$ KE/g ter v končnih med $9,0 \times 10^3$ in $1,2 \times 10^7$ KE/g. Tudi standardni odklon (Preglednica 11) je višji v primerjavi s kvasovkami ali enterobakterijami.

V Preglednici 12 iz stolpca za t-test odčitamo P-vrednost 0,648. Ker je ta vrednost večja od verjetnosti zaupanja 0,05, pomeni, da smo potrdili ničelno hipotezo, ki govori, da med testno in kontrolno skupino ni statistično značilnih razlik v koncentraciji mikroorganizmov v blatu. Za dodatno ponazoritev lahko na Sliki 13 vidimo, da sta si krivulji za testno in kontrolno skupino zelo blizu oz. se zelo prekrivata. P-vrednost je premo sorazmerna s površino prekritja krivulj.

Za kvantifikacijo bifidobakterij smo uporabili tudi metodo PCR v realnem času. Tarča analize s PCR v realnem času so bili v našem primeru geni za 16S rRNA, značilni za rod *Bifidobacterium*. Ker se ti po zaporedjih nukleotidov razlikujejo med posameznimi bakterijskimi vrstami, lahko v posameznih reakcijah ciljamo na različne skupine bakterij. Rezultati so prikazani kot logaritmirene vrednosti (\log_{10}) števila kopij gena za 16S rRNA/g blata. Za umeritveno krivuljo smo uporabili sev *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12. Bakterijska celica ima lahko različno število kopij genov (1–15) za 16S rRNA; število kopij je enako za seve, ki pripadajo isti vrsti, se pa razlikuje med vrstami. Bakterije rodu *Bifidobacterium* imajo 2–5 kopij teh genov. V vzorcih je bilo po vsej verjetnosti prisotnih več vrst bifidobakterij, ki imajo različno število kopij za 16S rDNA, zato rezultatov ne moremo preračunati neposredno v KE/g. Kadar analiziramo celotno DNA iz blata, je rezultat odvisen tako od tega, katere bakterijske vrste so v vzorcu, kot od njihovega števila. Kljub temu pa do neke mere odražajo

spremembe (če so te dovolj velike) v številu bakterij posameznih rodov oz. skupin, zato jih v zadnjem času veliko uporabljajo v ekoloških študijah.

Pri kvantifikaciji rodu *Bifidobacterium* s PCR v realnem času smo s t-testom potrdili hipotezo o enakosti povprečij populacij testne in kontrolne skupine. Rezultati so prikazani kot logaritmirane vrednosti (\log_{10}) števila kopij gena za 16S rRNA/g blata (Preglednica 13). Na Sliki 21 lahko vidimo, da sta gostoti verjetnostnih porazdelitev relativno podobni. Prekritost grafov je relativno velika, kar je t-test dejansko tudi numerično pokazal. Na osnovi tega sklepamo, da med skupinama ni statistično značilnih razlik.

Tudi koncentracija laktobacilov, ki smo jih določali na gojišču Rogosa z dodatkom ocetne kisline (anaerobna kultivacija, 37 °C/48–72 h), se v povprečnih vrednostih ni močneje razlikovala (Preglednica 9). Vrednosti med posamezniki so se v testni skupini pri začetnih vzorcih gibale od $9,0 \times 10^3$ do $1,5 \times 10^9$ KE/g, pri končnih pa od $9,0 \times 10^3$ do $1,1 \times 10^8$ KE/g, medtem ko so se v kontrolni skupini pri začetnih vzorcih gibale od $6,0 \times 10^4$ do $3,1 \times 10^8$ KE/g, pri končnih pa od $9,0 \times 10^3$ do $1,9 \times 10^8$ KE/g (Preglednica 6). Tudi pri rezultatih štetja laktobacilov smo potrdili ničelno hipotezo H_0 , da se populaciji testne in kontrolne skupine statistično ne razlikujeta, saj smo na osnovi izračunane vrednosti vzorčne statistike t odčitali $P = 0,197$ (Preglednica 12), ki je večja od $\alpha = 0,05$. To je prikazano tudi na Sliki 14, saj se gostoti verjetnostnih porazdelitev za testno in kontrolno skupino precej prekrivata ($P > \alpha$). Med populacijama testne in kontrolne skupine ni statistično značilnih razlik. Tudi pri laktobacilih je standardni odklon (Preglednica 11) višji v primerjavi z drugimi skupinami mikroorganizmov.

Iz Preglednice 9 je razvidno, da so bifidobakterije in laktobacili bili prisotni vse obdobje testiranja in da se povprečne vrednosti populacij kontrolne in tesne skupine statistično značilno ne razlikujejo. Lahko zaključimo, da se v blatu posameznikov, ki so med terapijo z antibiotiki ter še en teden po končani terapiji uživali probiotični pripravek, koncentracija bifidobakterij in laktobacilov ni značilno povečala, kot bi lahko pričakovali.

Iz Preglednice 11, ki kaže standardne odklone, je razvidno, da so pri bifidobakterijah in laktobacilih le-ti večji kot pri drugih skupinah bakterij. Pri bifidobakterijah vrednosti znašajo od 1,1 do $1,5 \log_{10}$ KE/g blata, pri laktobacilih pa od 1,2 do $1,7 \log_{10}$ KE/g blata. Pri preostalih bakterijah (*Enterococcus*, *Staphylococcus* in *Enterobacteriaceae*) se vrednosti gibljejo od 0,4 do največ $1,2 \log_{10}$ KE/g blata. Najmanjši standardni odklon smo zabeležili pri kvasovkah, od 0,3 do $0,8 \log_{10}$ KE/g blata, kar kaže na najmanjšo variabilnost v primerjavi z različnimi skupinami bakterij.

Koncentracijo bakterij rodu *Enterococcus* smo ugotavljali na selektivnem gojišču KAA. Med posamezniki se je število enterokokov pri testni skupini pred začetkom zdravljenja gibalo med $1,5 \times 10^3$ in $3,3 \times 10^6$ KE/g ter ob koncu zdravljenja med $1,5 \times 10^3$ in $3,2 \times 10^7$ KE/g. Pri kontrolni skupini med $3,6 \times 10^3$ in $1,4 \times 10^5$ KE/g na začetku zdravljenja, ob koncu pa $2,3 \times 10^4$ in $3,2 \times 10^7$ KE/g. Tudi za število enterokokov v blatu (KE/g) smo ugotovili, da se populaciji testne in kontrolne skupine statistično ne razlikujeta. S statistično analizo (t-test) smo izračunali vrednost $P = 0,999$ (Preglednica 12), ki je večja od $\alpha = 0,05$, torej smo potrdili H_0 . Na Sliki 15 lahko vidimo, da se grafa verjetnostnih porazdelitev skoraj popolnoma

prekrivata. Prekritost grafov je skoraj identična, kar pomeni, da so razlike med populacijama testne in kontrolne skupine zanemarljive.

Koncentracijo bakterij rodu *Staphylococcus* smo ugotavljali na selektivnem gojišču z manitolom. Med posamezniki se število stafilokokov v blatu ni razlikovalo tako močno kot pri bifidobakterijah ali laktobacilih. Pri testni skupini se je pred začetkom zdravljenja število KE/g gibalo med $9,0 \times 10^3$ in $3,8 \times 10^7$ KE/g ter ob koncu med $9,0 \times 10^3$ in $1,3 \times 10^6$ KE/g, pri kontrolni skupini pa med $9,0 \times 10^3$ in $7,5 \times 10^4$ KE/g ter med $9,0 \times 10^3$ in $5,9 \times 10^5$ KE/g. Na osnovi izračunane vrednosti vzorčne statistike (t-test) smo odčitali $P = 0,167 > \alpha = 0,05$ (Preglednica 12) in tudi za skupino stafilokokov potrdili H_0 , torej se populaciji testne in kontrolne skupine nista statistično razlikovali. Slika 16 kaže, da sta si gostoti verjetnostnih porazdelitev podobni oz. da se krivulji (za testno in kontrolno skupino), ki prikazujeta verjetnostno porazdelitev, precej prekrivata, tako da ne moremo govoriti o statistični razliki med obema skupinama.

Koncentracijo bakterij iz družine Enterobacteriaceae smo ugotavljali na selektivnem gojišču DHL pri $35\text{ }^\circ\text{C}/24\text{--}48\text{ h}$ in aerobni kultivaciji. Pri posameznikih je bila najnižja vrednost pri obeh skupinah $9,0 \times 10^3$ KE/g, pri testni skupini pa najvišja na začetku antibiotičnega zdravljenja $7,5 \times 10^6$ in ob koncu $9,9 \times 10^6$ KE/g blata. Pri določanju bakterij iz družine Enterobacteriaceae smo potrdili hipotezo o enakosti povprečij populacij testne in kontrolne skupine. S statistično analizo (t-test) smo izračunali vrednost $P = 0,465$ (Preglednica 12), ki je večja od $\alpha = 0,05$, torej smo zavrnili H_1 , ker se testni skupini statistično ne razlikujeta. Slika 17 kaže, da sta si gostoti verjetnostnih porazdelitev relativno podobni. Vidimo, da je prekritost grafov (površina pod krivuljama) velika, kar nam je pokazal tudi t-test.

Kvasovke smo šteli na selektivnem gojišču OGY z dodatkom antibiotika pri $28\text{ }^\circ\text{C}$ in po sedmih dneh aerobne kultivacije. Tudi pri kvasovkah se vrednosti znotraj skupin niso tako močno razlikovale kot pri bifidobakterijah in laktobacilih. Pri posameznikih v testni skupini smo na začetku in koncu zdravljenja določili najnižjo vrednost 9×10^3 KE/g blata, najvišjo pa 1×10^6 KE/g blata. Pri kontrolni skupini pa najnižjo vrednost prav tako 9×10^3 KE/g blata in najvišjo $6,4 \times 10^4$ KE/g blata. S statistično obdelavo podatkov za število kvasovk smo tako kot pri drugih skupinah bakterij potrdili hipotezo o enakosti povprečij populacij testne in kontrolne skupine. Izračunana vrednost vzorčne statistike (t-test), $P = 0,262$ (Preglednica 12), je večja od $\alpha = 0,05$, torej lahko zavrnemo H_1 . Slika 18 kaže, da sta si verjetnostni porazdelitvi obeh testnih skupin relativno podobni oz. se površini pod krivuljama precej prekrivata. Torej se povprečji populacije testne in kontrolne skupine statistično ne razlikujeta.

5.2 SKLEPI

- Uživanje antibiotikov in placebo (kontrolna/placebo skupina) oz. antibiotikov in probiotikov (testna skupina) ni statistično značilno vplivalo na koncentracijo izbranih skupin mikroorganizmov (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, Enterobacteriaceae in kvasovke).
- V blatu posameznikov, ki so med terapijo z antibiotiki ter še en teden po končani terapiji uživali probiotični pripravek, koncentracija bifidobakterij in laktobacilov ni bila večja kot v kontrolni skupini (antibiotična terapija brez probiotikov).
- V blatu posameznikov so bili bifidobakterije in laktobacili prisotni skozi vse obdobje testiranja, koncentracije pa so se med posamezniki močno razlikovale. Pri bifidobakterijah so se koncentracije gibale med $9,0 \times 10^3$ in $3,1 \times 10^8$ KE/g blata, pri laktobacilih pa med $9,0 \times 10^3$ in $1,5 \times 10^9$ KE/g blata.
- Tudi kvantifikacija bifidobakterij z metodo PCR v realnem času, s katero zajamemo poleg kultivabilnih še bakterije v vseh drugih fizioloških stanjih (žive nekultivabilne, nežive), ni pokazala značilnih razlik med skupinami ali med začetnim in končnim stanjem.

6 POVZETEK

Stranski učinek zdravljenja z antibiotiki je med drugim tudi diareja, ki se pojavi pri približno 5–39 % ljudi. Znano je, da lahko zaužitje probiotikov pozitivno učinkuje na prvotno mikrobioto in da lahko prepreči porušenje ravnovesja zaradi jemanja antibiotikov ter posledično diarejo. V naši nalogi smo na odraslih prostovoljcih raziskovali učinkovitost probiotičnega pripravka z laktobacili in bifidobakterijami za preprečevanje drisk, ki so posledica terapije z antibiotiki.

Od vsakega prostovoljca smo dobili po dva vzorca blata, od katerih je bil prvi odvzet pred začetkom terapije z antibiotiki in probiotiki oz. placebom, drugi pa takoj po končanem jemanju probiotičnega pripravka oz. placebo, ki so ga jemali še en teden po končani terapiji z antibiotikom. Ugotavljalni smo število KE/g blata, bifidobakterij, laktobacilov, enterokokov, stafilokokov, enterobakterij in kvasovk. Vzorce blata smo ustrezno razredčili in nacepili na selektivna gojišča za ugotavljanje števila (KE/g) različnih skupin bakterij z metodo štetja na ploščah.

Za testiranje hipotez smo izbrali Studentov t-test, s katerim smo ugotavliali morebitne statistično značilne razlike med testno in kontrolno skupino. Potrdili smo H_0 , ki pravi, da se populacija kontrolne skupine (antibiotik + placebo) in populacija testne skupine (antibiotik + probiotični pripravek) statistično ne razlikujeta. To smo potrdili pri vseh preiskovanih mikroorganizmih (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, Enterobacteriaceae, *Staphylococcus* in kvasovke).

Koncentracije preiskovanih bakterij so se med posamezniki znotraj iste skupine zelo razlikovale, med $9,0 \times 10^3$ do $9,0 \times 10^9$ KE/g blata, kar kaže na veliko razpršenost vzorcev.

Koncentracijo bifidobakterij smo določili tudi s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo (PCR) v realnem času, ki ne zahteva kultivacije bakterij.

DNA, na podlagi katere smo kvantificirali bifidobakterije, je prihajala iz nepoškodovanih in poškodovanih oz. mrtvih celic, zato smo pri metodi PCR v realnem času opazili nekoliko večje koncentracije kot pri štetju na ploščah, kjer zrastejo samo bakterije, ki niso poškodovane oz. kultivabilne bakterije.

Glede na hipotezo bi bilo pričakovati, da si bodo začetne vrednoti bifidobakterij in laktobacilov pri obeh skupinah približno podobne in da bodo končne vrednosti pri testni skupini ostale vsaj enake ali se rahlo dvignile, pri kontrolni skupini (placebo) pa da se bodo zaradi jemanja antibiotika pričakovano znižale.

Sklepamo lahko, da je črevesna mikrobiota zelo kompleksen ekosistem in da jo je zato težko raziskovati, saj je variabilnost med posamezniki že v osnovi, preden so kakorkoli tretirani, velika. Odvisna je od mnogo dejavnikov, kot so prehranjevalne navade, genetski dejavnik, izpostavljenost stresu itd. Čeprav raziskava ni pokazala značilnega povečanja števila laktobacilov in bifidobakterij v skupini, ki je prejemala probiotični pripravek z bakterijskima vrstama *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, pa so pri posameznikih lahko nastale spremembe tako v vrstni in sevni sestavi populacije laktobacilov

in bifidobaterij kakor tudi pri drugih skupinah mikroorganizmov. Take spremembe je mogoče ugotavljati le s sodobnimi metagenomskimi tehnikami.

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, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–45.
- Alander M., Mätto J., Kneifel W., Johansson M., Kögler B., Crittenden R., Mattila-Sandholm T., Saarela M. 2001. Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistance of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. International Dairy Journal, 11, 10: 817–825.
- Alvarez-Olmos M. I., Oberhelman R. A., 2001. Probiotic agents and infectious diseases: a modern prospective on a traditional therapy. Clinical Infectious Diseases, 32, 11: 1567–1576.
- Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gomersall L., Arya N., Patel H. R. N. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Review of Molecular Diagnostic, 5, 2: 209–219.
- Ataie-Jafari A., Larijani B., Alavi-Majd H., Tahbaz F. 2009. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subject. Annals of Nutrition and Metabolism, 54: 22–27.
- Barlett G.J. 2002. Antibiotic-associated diarrhea. New England Journal of Medicine, 346: 334–339.
- Bazzoli F., Zagari R. M., Fossi S. 1992. *In vivo Helicobacter pylori* clearance failure by *Lactobacillus acidophilus*. Gastroenterology, 102: A38–A38.
- Biavati B., Vescovo M., Torriani S., Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: History, ecology, physiology and applications. Annals of Microbiology, 50: 117–131.
- Bibek R., Arun B. 2008. Fundamental food microbiology. 4th ed. Boca Raton, Taylor & Francis Group, CRC Press: 163–174.
- Black F. T., Andersen P. L., Orskow J. 1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler's diarrhea. Travel Medicine, 7: 333–335.
- Busch U., Nitschko H. 1999. Methods for the differentiations of microorganisms. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 722, 1–2: 263–278.
- Chr. Hansen Company. 2001. *L. acidophilus*, *L. casei* and bifidobacteria in fermented milk products-Guidelines. Method for counting probiotic bacteria. Horsholm, Chr. Hansen Company: 4 str.
www.chr-hansen.com (april 2011)

- Deplancke B., Gaskins H. R. 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, Suppl. 1: 1131S–1141S.
- De Man J. D., Rogosa M. A., Sharpe M. E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23: 130–135.
- Dommels Y. E. M., Kemperman R. A., Zberegs Y. E. P., Draaisma R. B., Jol A., Wolvers D. A. W., Vaughan E. E., Albers R. 2009. Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 6198–6204.
- Fooks L. J., Fuller R., Gibson G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, 9, 1: 53–61.
- Fuller R. 1991. Probiotics in human medicine: Gut. *International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32: 439–442.
- Gardiner G. E., Ross R. P., Kelly P. M., Stanton C., Collins J. K., Fitzgerald G. 2002. Microbiology of therapeutic milks. V: *Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk product*. 3rd ed. Robinson R. K. (ed.). New York, John Wiley & Sons: 431–478.
- Gibellini D., Vitone F., Schiavone P., Ponti C., La Placa M., Re M. C. 2004. Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells by SYBR Green real-time PCR technique. *Journal of Clinical Virology*, 29, 4: 282–289.
- Gibson U. E., Heid C. A., Williams P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6: 995–1001.
- Gismondo M. R., Drago L., Lombardi A. 1999. Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, 4: 287–292.
- Goldin B. R., Gorbach S. L. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 39, 5: 756–761.
- Goldin B. R. 2003. Microflora of intestine. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 6. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 3904–3916.
- Gomes A. M. P., Malcata X. F. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Tehnology*, 10: 139–157

- Gustafsson A., Berstad A., Lund-Tonnesen S., Midtvedt T., Norin E. 1999. The effect of faecal enema on five microflora-associated characteristic in patients with antibiotic associated diarrhoea. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 34, 6: 580–586.
- Hose H., Sozzi T. 1991. Probiotics, fact and fiction. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 51, 4: 562–567.
- IDF Standard 100B. 1991. Milk and milk production- Enumeration of microorganisms- Colony count technique at 37 °C: 3 str.
- Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke. 2008. Povzetek glavnih značilnosti zdravila smpc. Ljubljana, Javna agencija RS za zdravila in medicinske pripomočke: 8 str. www.zdravila.net (april 2011).
- Kagnoff M.F., Eckmann L., Huang G., Kim P. H., Jung H., Fierer J., Morzyckawroblewska E. 1995. Cytokines regulate IgA production and provide early signals for the activation of immune and inflammatory responses in the mucosal environment. Journal of Cellular Biochemistry, 19, Suppl. 19A: S234–S234
- Klaenhammer T. R., Kullen M. J. 1999. Selection and design of probiotics. International Journal of Food Microbiology, 50, 1–2: 45–57.
- Koning C. J. M., Jonkers D. M. A. E., Stobberingh E. E., Muler L., Rombouts F. M., Stockbrügger R. W. 2007. The effect of a multispecies probiotic on the intestinal microbiota and bowel movements in healthy volunteers taking the antibiotic amoxycillin. American Journal of Gastroenterology, 102: 1–12.
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 123–209.
- Kuipers E. J., Surawicz C. M. 2008. *Clostridium difficile* infection. Lancet, 371: 1486–1488.
- Leuschner R. G. K., Bew J., Simpson P., Ross P. R., Stanton C. 2003. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacteria in animal feed. International Journal of Food Microbiology, 83, 2: 161–170.
- Mackay I. M. 2004. Review: real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10, 3: 190–212.
- Mattila-Sandholm T., Mätto J., Saarela M. 1999. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. International Dairy Journal, 9, 1: 25–35.
- Mätto J., Alakomi H.L., Vaari A., Virkajärvi I., Saarela M. 2006b. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factor affecting it. International Dairy Journal, 16, 9: 1029–1037.
- Mätto J., Fonden R., Tolvanen T., von Wright T., Vilpponen-Salmela T., Satokari R., Saarela M. 2006a. Intestinal survival and persistence probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*

- strains administered in triple-strain yoghurt. International Dairy Journal, 16, 10: 1174–1180.
- Medellin-Pena J. M., Griffiths W. M. 2008. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain LA-5 on *Escherichia coli* 0157:H7 colonization. Applied and Environmental Microbiology, 75, 4: 1165–1172.
- Michetti P., Dorta G., Wiesel P. H. 1999. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* Lal on *Helicobacter pylori* infection in humans. Digestion, 60, 3: 203–209.
- Mulder L. 2004. Prebiotics & probiotics. Amsterdam, Winclove Bio Industries BV: 44 str. www.waya.eu (april 2011)
- Naidu A. S., Bidlack W. R., Clemens R. A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 39, 1: 13–126.
- Oksanen P. J., Salminen S., Saxelin M. 1990. Prevention of travellers diarrhoea by *Lactobacillus GG*. Annals of Medicine, 22, 1: 53–56.
- Orel R. 2001. Vloga probiotikov pri preprečevanju in zdravljenju bolezni prebavil. V: Probiotiki in možnosti njihove uporabe. Pavčič M., Vitežić N. (ur.). Ljubljana, Zbornica nutrionicistov in dietetikov: 25–32.
- Orrhage K., Sillerström E., Gustafsson J. Å., Nord C. E., Rafter J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 311, 2: 239–248.
- Ouwehand A. C., Isolauri E., Kirjavainen P. V., Tölkö S., Salminen S.J. 2000. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus GG* and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Letters in Applied Microbiology, 30, 1: 10–13.
- Ouwehand A. C., Kirjavainen P., Shortt C., Salminen S. 1999. Probiotics: Mechanisms and established effects. International Dairy Journal, 9, 1: 43–52.
- Parvez S., Malik K. A., Kang A. H., Kim H. Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal Applied of Microbiology, 100, 6: 1171–1185.
- Poljak M., Avšič-Županc T., Seme K. 1994. Verižna reakcija s polimerazo – nova raziskovalna in diagnostična metoda v virologiji. Medicinski razgledi, 33: 379–400.
- Radšel - Medvešček A. 2002. Driske, ki jih povzroča *Clostridium difficile*, in driske, povezane z antibiotičnim zdravljenjem. V: Infekcijske bolezni. Marolt - Gomiščak M., Radšel - Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 125–129.
- Read S.J. 2001. Recovery efficiencies of nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler™ PCR. Journal of Clinical Pathology, 54: 86–90.

- Rivera-Espinoza Y., Gallardo-Navarro Y. 2010. Non-dairy probiotic product. *Food Microbiology*, 27, 1: 1–11.
- Rogosa M., Mitchel J. A., Wiseman R. F. 1951. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 62: 132–133.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Matto J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 3: 197–215.
- Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M. C., Cummings J. H., Franck A., Gibson G. R., Isolauri E., Moreau M. C., Roberfroid M., Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80, Suppl. 1: S147–S171.
- Savard P., Lamarche B., Paradis M. E., Thiboutot H., Laurin E., Roy D. 2011. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 1: 50–57.
- Schmidt B. L. 1997. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 10, 1: 185–201.
- Sparks S. G., Carman R. J., Sarker M. R., McClane B. A. 2001. Genotyping of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* fecal isolates associated with antibiotic-associated diarrhea and food poisoning in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3: 883–888.
- Tannock G. W. 2001. Molecular assessment of intestinal microflora. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, Suppl. 2: 410S–414S.
- Timmerman H. M., Koning C. J. M., Mulder L., Rombouts F. M., Beynen A. C. 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics- a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 3: 219–233.
- Treptow-van Lishaut S., Rechkemmer G., Rowland I. R., Dolara P., Pool-Zobel B. L. 1999. The carbohydrate crystalean and colonic microflora modulate expression of glutathione S-transferase subunits in colon of rats. *European Journal of Nutrition*, 38, 2: 76–83.
- Turpin W., Humblot C., Thomas M., Guyot J.P. 2010. Lactobacilli as multifaceted probiotics with poorly disclosed molecular mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 3: 87–102.
- Vahtovuo J., Toivanen P., Erola E. 2003. Bacterial composition of murine fecal microflora is indigenous and genetically guided. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 1: 131–136.
- Weng M., Walker W. A., 2006. Bacterial colonization, probiotics and clinical disease. *Journal of Pediatrics*, 149, Suppl. 5: S107–S114.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici, viš. znan. sod. dr. Bojani Bogovič Matijašić, za pomoč pri nastajanju in pregledu diplomske naloge, izvajanju laboratorijskega dela ter za trud in čas, ki si ga je vzela za moja vprašanja.

Za strokovno recenzijo se zahvaljujem prof. dr. Sonji Smole Možina.

Hvala za pomoč in prijaznost zaposlenim v laboratoriju na Katedri za mlekarstvo, predvsem pa mladima raziskovalcema Primožu Trevenju in Roku Novaku.

Za pomoč pri urejanju in iskanju literature se zahvaljujem ge. Lini Burkan in ge. Barbari Slemnik.

Darji Koren za lektoriranje diplomske naloge.

Alešu za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Za podporo in pomoč v času študija hvala tudi staršema in sestri Nini ter vsem prijateljem.