

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matic KONJAR

**ODPORNOST NA PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE  
IN INVAZIVNOST PROBIOTIČNIH KVASOVK  
*Saccharomyces boulardii* (*nom.nud.*)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Matic KONJAR

**ODPORNOST NA PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE IN INVAZIVNOST  
PROBIOTIČNIH KVASOVK *Saccharomyces boulardii* (*nom.nud.*)**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

**RESISTANCE TO ANTIFUNGAL AGENTS AND INVASIVENESS OF PROBIOTIC  
YEAST *Saccharomyces boulardii* (*nom.nud.*)**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Prehrana. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorja dr. Jureta Zupana in za recenzenta prof. dr. Roka Orla.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentor: dr. Jure Zupan

Recenzent: prof. dr. Rok Orel

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Matic Konjar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2  
DK UDK 579.22/.24:582.282.23:615.282(043)=163.6  
KG *Saccharomyces boulardii*/probiotične kvasovke/pH vrednost/invazivnost/odpornost/  
protiglivične učinkovine/modulatorni učinki/glivne okužbe  
AV KONJAR, Matic, dipl. inž. živ. in preh. (UN)  
SA RASPOR, Peter (mentor)/ZUPAN, Jure (somentor)/OREL, Rok (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2015  
IN ODPORNOST NA PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE IN INVAZIVNOST  
PROBIOTIČNIH KVASOVK *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.)  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana)  
OP XII, 89 str., 17 pregl., 44 sl., 127 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V zadnjih letih je povečana uporaba probiotične kvasovke *Saccharomyces boulardii* povezana z povečanjem poročil o glivnih okužbah imunsko oslabljenih pacientov po terapiji s *S. boulardii*. Namen magistrskega dela je bil preveriti potencialno nevarnost probiotične kvasovke. V delu smo preverili odpornost komercialnih probiotikov na protiglivične učinkovine in njihovo invazivnost, kot tudi modulatorne učinke medicinskih učinkovin na občutljivost probiotičnih kvasovk na protiglivične učinkovine ter sposobnost preživetja probiotične kvasovke pri različnih vrednostih pH. Pri vseh testih smo za statistično primerjavo testirali tudi patogene seve kvasovk *Candida glabrata*, *Candida krusei* ter *Saccharomyces cerevisiae*. S testom protiglivične občutljivosti standarda CLSI smo ugotovili, da probiotične kvasovke v večini ne kažejo odpornosti na testirane protiglivične učinkovine (flukonazol, itrakonazol, amfotericin B in kaspofungin). S kvantitativnim testom invazije v agar smo ovrgli invazivno rast probiotičnih kvasovk. Pri testiranju modulatornih učinkov z CLSI testom smo ugotovili antagonistični učinek imunosupresiva MPA na občutljivost *S. boulardii* na azolni protiglivični učinkovini, medtem ko smo pri imunosupresivu FK506 opazili sinergistični učinek na občutljivost *S. boulardii* na omenjeni protiglivični učinkovini. S testiranjem rasti pri različnih vrednostih pH (2; 5; 6,5; 8), v časovnih intervalih značilnih za posamezne dele prebavil smo ugotovili, da število probiotikov v kapsulah, ki dosežejo tarčno mesto v tankem črevesju ustrezai koncentraciji probiotikov potrebnih za pozitivno učinkovanje. Študija kaže, da komercialni probiotični sevi niso odporni na testirane protiglivične učinkovine ter niso nevarni s stališča invazivne rasti v agar.

## KEY WORD DOCUMENTATION

DN Du2  
DC UDC 579.22/.24:582.282.23:615.282(043)=163.6  
CX *Saccharomyces boulardii*/probiotic yeasts/pH values/invasivness/resistance/  
antifungal agents/modulatory effect/fungal infections  
AU KONJAR, Matic  
AA RASPOR, Peter (supervisor)/ZUPAN, Jure (co-advisor)/OREL, Rok (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
PY 2015  
TI RESISTANCE TO ANTIFUNGAL AGENTS AND INVASIVNESS OF  
PROBIOTIC YEAST *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.)  
DT M. Sc Thesis (Master Study Programmes: Field Nutrition)  
NO XII, 89 p., 17 tab., 44 fig., 127 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Increased use of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in recent decades is associated with an increase reports of fungal infection in immunocompromised patients after treatment with *S. boulardii*. The purpose of the thesis was to examine the potential danger of probiotic yeast. In thesis we researched the resistance of commercial yeast probiotics to an antifungal agents and their invasivness. We also examine modulatory effects of medical substances on the sensitivity of the probiotic strans on tested antifungal substance and the viability of the probiotic yeasts at different pH values. For statistical comparison in mentioned assays we have also tested pathogenic strains of the yeasts *Candida glabrata*, *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae*. With antifungal CLSI assay we found out that the majority of yeast probiotics do not show resistance to tested antifungal agents (fluconazole, itraconazole, amphotericin B and caspofungin). Quantitative agar invasion assay proved that non of the yeast probiotics grown invasive. While testing modulator effect with CLSI assay we found out antagonistic effect of the immunosupresant MPA to the sensitivity of probiotic yeasts to antifungal agents itraconazole and fluconazole, and synergistic effect of immunosupressant FK506 to the sensitivity of the probiotic yeasts to mentioned antifungal agents. With testing of growth at various pH values (2; 5; 6,5;8) in the time intervals specific to the parts of the gastrointestinal tract we found out that the conectratration of cells in commercial probiotics matches the minimal conenctratration of probiotics necessary for the positive effects. The thesis shows that commercial probiotics yeasts are not resistant to antifungal agents and dangerous from the standpoint of invasive growth in agar.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORD DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>XI</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 PROBIOTIKI.....	3
<b>2.1.1 Definicija probiotikov .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Varnostne zahteve probiotikov .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Vrste probiotikov.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.4 Mehanizmi delovanja .....</b>	<b>7</b>
2.2 PROBIOTIK <i>SACCHAROMYCES BOULARDII</i> .....	8
<b>2.2.1 Zgodovina .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2 Karakteristike .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.3 Identifikacija .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.4 Delovanje .....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.5 Uporaba .....</b>	<b>13</b>
2.3 GLIVNE OKUŽBE .....	13
<b>2.3.1 Statistika glivnih okužb.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2 Primerjava splošnih in imunooslabljenih pacientov .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.3 Pregled glivnih okužb s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.4 Pregled glivnih okužb s kvasovko <i>S. boulardii</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.5 Razlogi za porast števila okužb s probiotično kvasovko <i>S. boulardii</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.6 Varnost uporabe <i>S. boulardii</i>.....</b>	<b>17</b>
2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI KVASOVKE <i>S. BOULARDII</i> .....	17
<b>2.4.1 Rast pri telesni temperaturi človeka (nad 37 °C) .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.2 Imunomodulacija.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.3 Adhezija.....</b>	<b>18</b>
<b>2.4.4 Invazivna rast.....</b>	<b>18</b>
2.5 ODPORNOST NA PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE .....	19
2.6 PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE.....	20
<b>2.6.1 Pregled protigličnih učinkovin in mehanizmi delovanja .....</b>	<b>21</b>
<b>2.6.2 Modulatorni učinki.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>25</b>
3.1 HODOGRAM POSKUSA .....	25
3.2 MATERIALI .....	26
<b>3.2.1 Mikroorganizmi .....</b>	<b>26</b>

3.2.2 Gojišča .....	27
3.2.3 Oprema .....	29
3.3 METODE.....	30
3.3.1 Izolacija sevov <i>S. boulardii</i> .....	30
3.3.2 Določanje rasti <i>S. boulardii</i> pri različnem pH.....	31
3.3.3 Določanje invazivne rasti probiotika <i>S. boulardii</i> .....	31
3.3.4 Določanje protiglivične odpornosti probiotika <i>S. boulardii</i> s pomočjo testa občutljivosti protiglivičnih učinkovin standarda CLSI .....	32
3.3.5 Testiranje modulatornih učinkov (sinergizem/antagonizem) medicinskih učinkovin na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> na protiglivične učinkovine .....	35
4 REZULTATI.....	39
4.1 IZOLACIJA PROBIOTIKA <i>S. BOULARDII</i> .....	39
4.1.1 Število celic v kapsulah komercialnih probiotikov.....	39
4.1.2 Primerjava metod "ImageJ" in CFU na kapsulo.....	40
4.2 RAST PROBIOTIKA <i>S. BOULARDII</i> PRI RAZLIČNEM PH .....	41
4.2.1 Rast probiotika <i>S. boulardii</i> pri pH 2 ob dodatku pepsina .....	41
4.2.2 Rast probiotika <i>S. boulardii</i> pri pH 5 in 6,5 .....	43
4.2.3 Rast probiotika <i>S. boulardii</i> pri pH 8.....	46
4.2.4 Rast probiotika <i>S. boulardii</i> v primerjavi z rastjo patogenih sevov <i>C. glabrata</i> in <i>S. cerevisiae</i> pri testiranih pH vrednostih. ....	48
4.2.5 Koncentracija celic v probiotičnih kapsulah, ki bi glede na preživelost pri različnih pH vrednostih dosegla tarčno mesto v tankem črevesju.....	48
4.3 INVAZIVNA RAST PROBIOTIKA <i>S. BOULARDII</i> .....	49
4.3.1 Invazivna rast probiotika <i>S. boulardii</i> pri 37 °C in 39 °C .....	49
4.3.2 Invazivna rast probiotika <i>S. boulardii</i> pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin.....	52
4.3.3. Primernost probiotične kvasovke <i>S. boulardii</i> s stališča invazivnosti.....	56
4.4 PROTIGLIVIČNA ODPORNOST PROBIOTIKA <i>S. BOULARDII</i> .....	57
4.4.1 Odpornost probiotika <i>S. boulardii</i> na protiglivično učinkovino amfotericin B .....	57
4.4.2 Odpornost probiotika <i>S. boulardii</i> na protiglivično učinkovino itrakonazol .....	58
4.4.3 Odpornost probiotika <i>S. boulardii</i> na protiglivično učinkovino flukonazol	59
4.4.4 Odpornost probiotika <i>S. boulardii</i> na protiglivično učinkovino kaspofungin .....	60
4.4.5 Sevi odporni na testirane protiglivične učinkovine .....	61
4.4.6 Posebnosti pri določanju odpornosti na protiglivične učinkovine .....	61
4.4.7 Primerjava vrednosti MIC določene s testom invazivne rasti v agar ter testom standarda CLSI .....	63
4.5 MODULATORNI UČINKI (SINERGIZEM/ANTAGONIZEM) MEDICINSKIH UČINKOVIN NA OBČUTLJIVOST SEVOV <i>S. BOULARDII</i> NA PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE .....	64
4.5.1 Modulatorni učinki antibiotika vankomicina na rast <i>S. boulardii</i> ob dodatku protiglivičnih učinkovin amfotericin B, flukonazol in itrakonazol.....	64

<b>4.5.2 Modulatorni učinki imunosupresiva MPA na rast <i>S. boulardii</i> ob dodatku protigliivičnih učinkovin amfotericin B, flukonazol in itrakonazol.....</b>	<b>66</b>
<b>4.5.3 Modulatorni učinki imunosupresiva FK 506 na rast <i>S. boulardii</i> ob dodatku protigliivičnih učinkovin amfotericin B, flukonazol in itrakonazol.....</b>	<b>68</b>
<b>5 RAZPRAVA.....</b>	<b>71</b>
<b>5.1 PREŽIVETVENE SPOSOBNOSTI PROBIOTIKA <i>S. BOULARDII</i> (PH, T, KONCENTRACIJA).....</b>	<b>71</b>
<b>5.1.1 Komercialni probiotik <i>S. boulardii</i> .....</b>	<b>71</b>
<b>5.1.2 Primerjava metod "ImageJ" in metode CFU.....</b>	<b>72</b>
<b>5.1.3 Vpliv temperature in pH na živost <i>S. boulardii</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1.4 Primerjava živosti <i>S. boulardii</i> s patogenim sevom <i>Candida glabrata</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2 VARNOSTNI ASPEKT PROBIOTIKA <i>S. BOULARDII</i>.....</b>	<b>73</b>
<b>5.2.1 Invazivnost probiotika <i>S. boulardii</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>5.2.2 Primerjava invazivnosti <i>S. boulardii</i> s patogenim sevom <i>C. glabrata</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.3 Odpornost <i>S. boulardii</i> na protigliivične učinkovine .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.4 Primerjava odpornosti <i>S. boulardii</i> s sevi <i>C. glabrata</i> in <i>C. krusei</i> .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2.5 Potencialna nevarnost komercialnega pekovskega kvasa PEK1 .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.6 Primerjava MIC na trdnih in tekočih gojiščih .....</b>	<b>75</b>
<b>5.2.7 Slaba rast <i>S. boulardii</i> na gojišču RPMI.....</b>	<b>75</b>
<b>5.3 MODULATORNI UČINKI .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.1 Modulatorni učinki medicinskih učinkovin na občutljivost <i>S. boulardii</i> na protigliivične učinkovine .....</b>	<b>76</b>
<b>5.3.2 Potencialna uporaba protigliivične učinkovine kapsofungin skupaj z gojiščem SAB .....</b>	<b>77</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>78</b>
<b>7 POVZETEK (SUMMARY) .....</b>	<b>79</b>
<b>7.1 POVZETEK.....</b>	<b>79</b>
<b>7.2 SUMMARY.....</b>	<b>80</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>81</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: FAO/WHO smernice za odobritev probiotičnih sevov za uporabo v živilih (WHO/FAO, 2001) .....	4
Slika 2: Frekvenca recenzij različnih publikacij v zvezi s probiotično kvasovko <i>S. boulardii</i> (McFarland, 2010) .....	8
Slika 3: Elektronsko mikroskopska slika kvasovke <i>S. boulardii</i> (A). Slepо črevo miši 3h po zaužitju 30 mg <i>S. boulardii</i> (B) (Czerucka in Rampal, 2002) .....	9
Slika 4: Mehanizem delovanja proteaze (>50 kD) kvasovke <i>S. boulardii</i> (Sb), ki cepi toksin A in B patogene bakterije <i>C. difficile</i> ter proizvodnja majhnega (<10 kD) faktorja, ki inhibira vnetno pot (Im in Pothoulakis, 2010) .....	11
Slika 5: Shema črevesnega trakta ter različnih mehanizmov delovanja <i>S. boulardii</i> (Bassetti in sod., 1998; Riquelme in sod., 2003; McFarland, 2010) .....	12
Slika 6: Enocelična oblika kvasovke (A); Pseudohifna oblika (B) (Robin, 2010) .....	19
Slika 7: Ureditev biomolekularnih komponent celične stene (Myers, 2006) .....	20
Slika 8: Struktura formula flukonazola (Shalini in sod., 2011) .....	21
Slika 9: Nezmožnost pretvorbe lanosterola v ergosterol (Myers, 2006) .....	21
Slika 10: Struktura formula itrakonazola (Shalini in sod., 2011) .....	22
Slika 11: Interakcija med amfotericinom B in holesterolom v fosfolipidnem dvosloju (Ghannoum in sod., 1999) .....	22
Slika 12: Struktura formula amfotericina B (Myers, 2006) .....	23
Slika 13: Struktura formula kaspofungina (Myers, 2006) .....	23
Slika 14: Hodogram poskusa .....	25
Slika 15: Vrednost absorbance (OD 650) testirane probiotične kvasovke PRO 2 (mikrotitrská plošča z 96 jamicami) na grafu s pomočjo katerega smo določili vrednost MIC, v tem primeru protiglivične učinkovine amfotericin B (MIC pri 0,125 µg/ml) .....	35
Slika 16: Pregled vrednosti števila kvasovk v analiziranih vzorcih probiotičnih preparatov v primerjavi s klasičnim pekovskim kvasom .....	39
Slika 17: Primerjava relativnih standardnih deviacij med metodama "ImageJ" in CFU na kapsulo, za določevanje števila živih celic v testiranih komercialnih probiotikih (PRO1-5) in pri komercialnem kvasu (PEK1) .....	41
Slika 18: Živost probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO1-5) v različnih časovnih intervalih pri kislem pH 2 ob dodatku pepsina na 37 °C, v primerjavi z živostjo patogenih sevov ( <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. glabrata</i> ) .....	42
Slika 19: Stopnja preživelosti probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO1-5) in patogenih sevov <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. glabrata</i> po 3-urni inkubaciji na 37 °C v kislem pH 2 ob dodatku pepsina .....	42
Slika 20: Živost probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO1-5) v različnih časovnih intervalih pri kislem pH 5 ter 37 °C na gojišču CMGM, v primerjavi z živostjo patogenih sevov ( <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. glabrata</i> ) .....	44
Slika 21: Stopnja preživelosti probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO1-5) in patogenih sevov <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. glabrata</i> po 24-urni inkubaciji na 37 °C v kislem pH 5 ter 37 °C na gojišču CMGM .....	44
Slika 22: Živost probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO1-5) v različnih časovnih intervalih pri kislem pH 6,5 ter 37 °C na gojišču CMGM, v primerjavi z živostjo patogenih sevov <i>S. cerevisiae</i> , <i>C. glabrata</i> .....	45

Slika 23: Stopnja preživelosti probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO1-5) in patogenih sevov <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. glabrata</i> po 24-urni inkubaciji na 37 °C v kislem pH 6,5 na gojišču CMGM.....	46
Slika 24: Živost probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO 1-5) v različnih časovnih intervalih pri bazičnem pH 8 na 37 °C v primerjavi z živostjo patogenih sevov ( <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. glabrata</i> ) .....	47
Slika 25: Stopnja preživelosti probiotika <i>S. boulardii</i> (PRO1-5) in patogenih sevov <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. glabrata</i> po 24-urni inkubaciji na 37 °C v bazičnem pH 8.....	47
Slika 26: Število celic v kapsulah komercialnih probiotikov (PRO1-5), ki bi glede na preživelost pri različnih vrednosti pH prebavnega sistema dosegle tarčno mesto v tankem črevesju .....	49
Slika 27: Invazivna rast testiranih sevov komercialnih probiotikov (PRO1-5), potencialnih probiotikov ( <i>S. boulardii</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>T. delbrueckii</i> ), patogenih kvasovk ( <i>C. glabrata</i> in <i>C. krusei</i> ) ter pekovske kvasovke (PEK1) pri 37 °C in 39 °C. ....	51
Slika 28: Invazivna rast testiranih sevov (PRO5, PRO1, PRO3, pekovski kvas PEK1 in <i>C. glabrata</i> ) pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine amfotericin B ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	53
Slika 29: Invazivna rast testiranih sevov (PRO1, pekovski kvas PEK1 in <i>C. glabrata</i> ) pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine flukonazol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). ....	54
Slika 30: Invazivna rast testiranih sevov (PRO1, PRO3, PRO5, pekovski kvas PEK1 in <i>C. glabrata</i> ) pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine itrakonazol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). ....	55
Slika 31: Invazivna rast testiranih sevov (PRO1, PRO2, pekovski kvas PEK1 in <i>C. glabrata</i> ) pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine kaspofungin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). ....	56
Slika 32: Vrednost MIC komercialnih probiotikov (PRO1-5), potencialnih probiotikov ( <i>S. boulardii</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>T. delbrueckii</i> ), patogenih kvasovk ( <i>C. glabrata</i> in <i>C. krusei</i> ) ter pekovske kvasovke (PEK1) za protiglivični učinkovino amfotericin B. Odebeljena črna črta označuje mejno vrednost za odpornost seva. ....	58
Slika 33: Vrednost MIC komercialnih probiotikov (PRO1-5), potencialnih probiotikov ( <i>S. boulardii</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>K. lactis</i> , <i>T. delbrueckii</i> ), patogenih kvasovk ( <i>C. glabrata</i> in <i>C. krusei</i> ) ter pekovske kvasovke (PEK1) za protiglivično učinkovino itrakonazol. Odebeljena črna črta označuje mejno vrednost za odpornost seva.....	59
Slika 35: Vrednost MIC komercialnih probiotikov (PRO1-5) in potencialnih probiotikov ( <i>S. boulardii</i> ) za protiglivično učinkovino kaspofungin. Odebeljena črna črta označuje mejno vrednost za odpornost seva. ....	61
Slika 36: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine vankomicin (antibiotik) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO5) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine amfotericin B. ....	65
Slika 38: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine vankomicin (antibiotik) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO5) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine itrakonazol. ....	66
Slika 39: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine MPA (imunosupresiv) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO1) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine amfotericin B. ....	67

Slika 40: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine MPA (imunosupresiv) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO1) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine flukonazol. ....	67
Slika 41: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine MPA (imunosupresiv) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO1) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine itrakonazol. ....	68
Slika 42: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine FK506 (imunosupresiv) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO1) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine amfotericin B. ....	69
Slika 43: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine FK506 (imunosupresiv) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO1) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine flukonazol. ....	69
Slika 44: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine FK506 (imunosupresiv) na občutljivost sevov <i>S. boulardii</i> (PRO1) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine itrakonazol. ....	70

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Priporočila za uporabo probiotičnih bakterij (Floch in sod., 2011).....	6
Preglednica 2: Klinične karakteristike 13 pacientov s fungemijo <i>S. boulardii</i> (Sb) (Hennequin in sod., 2000; Thygesen in sod., 2012).....	16
Preglednica 3: Sevi uporabljeni v magistrskem delu ter njihov namen .....	26
Preglednica 4: Raztopina za hranjenje kvasovk .....	27
Preglednica 5: Sestava CMGM gojišča.....	28
Preglednica 6: Končna koncentracija protigliivičnih učinkovin amfotericin B in itrakonazol .....	33
Preglednica 7: Končna koncentracija protigliivične učinkovine flukonazol .....	34
Preglednica 8: Končna koncentracija protigliivične učinkovine kaspofungin .....	34
Preglednica 9: Končna koncentracija medicinske učinkovine MPA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) .....	37
Preglednica 10: Končna koncentracija medicinske učinkovine FK506 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	38
Preglednica 11: Končna koncentracija medicinske učinkovine vankomicin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).....	38
Preglednica 12: Točno določene meje standarda CLSI (CLSI, 2008; CLSI, 2010), ki definirajo občutljivost in odpornost kvasovk na protigliivične učinkovine. ....	57
Preglednica 13: Primerjava vrednosti MIC testiranih protigliivičnih učinkovin na gojišču SAB in RPMI.....	62
Preglednica 14: Primerjava vrednosti MIC patogenih sevov, ki kažejo visoko odpornost na protigliivično učinkovino kaspofungin na gojišču SAB in RPMI .....	62
Preglednica 15: Sestava gojišča SAB (Sigma-Aldrich, 2015b) .....	62
Preglednica 16: Sestava gojišča RPMI (Sigma-Aldrich, 2015a).....	63
Preglednica 17: Primerjava MIC in MICING vrednosti testiranih sevov ( <i>C. glabrata</i> , pekovski kvas PEK 1 in probiotična kvasovka PRO 1), določene s testom invazivne rasti v agar (INV) ter testom standarda CLSI .....	64

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AmB	Protigliivična učinkovina amfotericin B (amphotericin B)
CDC	Center za nadzor nad boleznimi in preventivo (Centers for Disease Control and Prevention)
CLSI	Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute)
CMGM	Gojišče za simulacijo prebavnega trakta (complex colonic model growth medium)
DSPK	Dvojno slepa, placebo kontrolirana študija
EFSA	Evropska agencija za varnost hrane (European Food Safety Authority)
FAO	Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (Food and Agriculture Organization)
FBS	Fetalni goveji serum (Fetal Bovine Serum)
FCZ	Protigliivična učinkovina flukonazol (fluconazole)
FK506	Imunosupresiv takrolimus (tržno ime FK-506)
GRAS	Splošno priznan kot varen (generally recognized as safe)
ICZN	Kodeks poimenovanja živali (International Commission on Zoological Nomenclature)
MIC	Minimalna inhibitorna koncentracija (minimum inhibitory concentration)
MICING	Minimalna inhibitorna koncentracija invazivne rasti (minimal inhibitory concentration for invasive growth)
MPA	Mikofenolna kislina (mycophenolic acid)
PBS	Fosfatni pufer s soljo (phosphate buffered saline)
PEK	Komercialni pekovski kvas <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PRO	Komercialna probiotična kvasovka <i>Saccharomyces boulardii</i>
RPMI	Definiran medij za kultivacijo sesalskih in drugih celic (Roswell Park Memorial Institute medium)
SAB	Gojišče za kultivacijo kvasovk (sabouraud dextrose broth)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (Wordl Health Organization)
YNB	Kvasna dušikova baza (yeast nitrogen base)
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov

## 1 UVOD

V 21. stoletju, se uporaba probiotične kvasovke *Saccharomyces boulardii* zaradi ugodnih učinkov povečuje, kar se kaže v povečanemu številu komercialno razpoložljivih probiotikov (Traval®, SwansonProbiotic®, InternaCalm®, Ultra-Levure®, Florastor®...). Probiotična kvasovka se predpisuje za zdravljenje z antibiotiki povzročene akutne diareje, infekcij z bakterijo *Clostridium difficile* ter posredno za izboljšano delovanje prebavnega sistema.

Kljub temu da ima *S. boulardii* GRAS (splošno priznana kot varna) status in se smatra kot varen probiotik lahko v zadnjih desetletjih v literaturi zasledimo povečano tendenco glivnih okužb pri imunsko oslabljenih pacientih po zdravljenju s probiotično kvasovko *S. boulardii* (Bassetti in sod., 1998; Cesaro in sod., 2000; Hennequin in sod., 2000; Lherm in sod., 2002; Cassone in sod., 2003; Riquelme in sod., 2003; Boyle in sod., 2006; Graf in Gavazzi, 2007; Thygesen in sod., 2012). Naraščanje okužb s *S. boulardii* je verjetno posledica rasti rabe probiotičnih preparatov, ki jo vsebujejo pri bolnikih z dodatnimi dejavniki tveganja. Nadaljnjo lahko poleg okužb v literaturi zasledimo tudi primere smrti zaradi sepse s probiotikom *S. boulardii* (Piarroux in sod., 1999).

Dodatno težavo predstavlja dejstvo, da je probiotična kvasovka genetsko zelo podobna kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. Znanstveniki so si na tem področju neenotni, saj na eni strani probiotično kvasovko s trenutnimi taksonomskimi ključi ni mogoče opredeliti kot svojo vrsto ampak se jo opredeluje le kot sev *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle in sod., 2005), na drugi strani pa so znanstveniki z nekaterimi metodami že razlikovali med kvasovkama *S. cerevisiae* in *S. boulardii* (Mitterdorfer in sod., 2002; Cassone in sod., 2003; van der Aa Kuhle in Jespersen, 2003). Neprimerne metode ločevanja kvasovk, bi lahko vodile v to, da so nekatere sistemske okužbe s *S. cerevisiae* pripisali *S. boulardii* in obratno, kot je bilo to opaženo pri nekaterih primerih (Bassetti in sod., 1998; Cesaro in sod., 2000; Riquelme in sod., 2003; de Llanos in sod., 2006b). Leta 2005 so tako pri pregledu glivnih okužb s strani rodu *Saccharomyces* ugotovili, da naj bi bila probiotična kvasovka *S. boulardii* odgovorna kar za 40,2 % infekcij povzročenih s *S. cerevisiae* (Angoulvant in Hennequin, 2005).

Raziskave odpornosti na protigliivične učinkovine in invazivnost probiotične kvasovke *S. boulardii* so tako pomembne za boljše razumevanje in zdravljenje potencialnih okužb s probiotično kvasovko *S. boulardii* pri imunsko oslabljenih pacientih.

### 1.1 CILJ DELA

Cilj magisterskega dela je bil določiti protigliivično občutljivost in invazivnost komercialno razpoložljivih probiotikov *S. boulardii*. Ugotoviti modulatorne (sinergistične in antagonistične) učinke medicinskih učinkovin (imunosupresivov) pri tretiranju *S. boulardii* s protigliivičnimi učinkovinami, ter določiti sposobnost rasti probiotične kvasovke pri različnih vrednostih pH.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

### Hipoteza 1. RAST PROBIOTIKA *S. boulardii* PRI RAZLIČEM pH:

- Rast bo boljša v nizkem kot v bazičnem pH, ter dobra v Complex Colonic Model Growth Medium (simulira črevo).

### Hipoteza 2. INVAZIVNA RAST PROBIOTIKA *S. boulardii*:

- Komercialni probiotični sevi *S. boulardii* bodo slabo invazivni. To bo na testu vidno kot površinska rast kolonij.

### Hipoteza 3. PROTIGLIVIČNA ODPORNOST PROBIOTIKA *S. boulardii*:

- Komercialni probiotični sevi bodo imeli nizko odpornost na protiglivične učinkovine.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PROBIOTIKI

#### 2.1.1 Definicija probiotikov

Beseda »probiotik« izhaja iz grške izpeljanke besede bios, ki pomeni življenje. Termin je bil sprva uporabljen kot protipomenka besedi »antibiotik« (Vasiljevic in Shah, 2008). V zgodovini je poznanih več različnih definicij probiotikov, med pomembnejšimi je definicija Roya Fullerja, ki je leta 1989 kot prvi definiral probiotike kot živo mikrobiološko prehransko dopolnilo, ki koristno vpliva na gostitelja z izboljševanjem njegovega mikrobiološkega ravnovesja (Kotzampassi in Giamarellos-Bourboulis, 2012). Danes probiotike povezujemo z živimi probiotičnimi bakterijami oziroma živimi mikroorganizmi, ki lahko ob zaužitju koristno vplivajo na zdravje ljudi. Probiotiki igrajo pomembno vlogo v človeški prehrani. Število objav povezanih z raziskovanjem, karakterizacijo in preverjanjem potencialnih zdravstvenih koristi uporabe probiotikov, pa se v zadnjih letih občutno povečuje (Saad in sod., 2013).

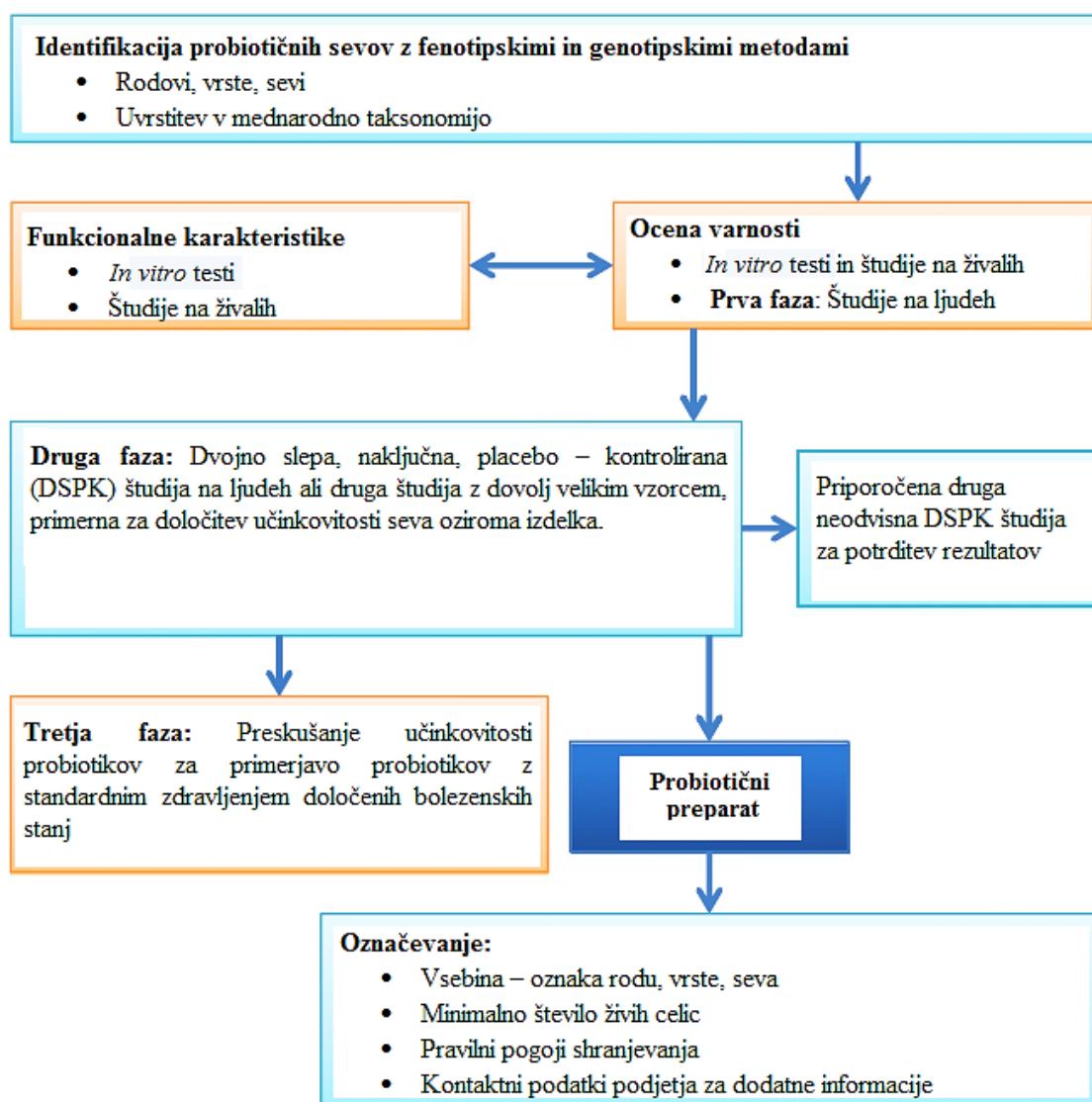
Do danes na svetu še ni uradne definicije probiotikov. Večina znanstvene javnosti sprejema definicijo organizacij WHO (World Health Organization) in FAO (Food and Agriculture Organization), ki navajata, da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki zaužiti v primernih količinah koristno vplivajo na zdravje gostitelja (WHO/FAO, 2001). Kljub širši veljavni same definiciji ni sprejeta v Evropski Uniji oziroma s strani EFSA-e (European Food Safety Authority), saj naj bi izraz »probiotik« namigoval na zdravstveno trditev, ki za probiotike do danes še ni potrjena. Težave so v Evropski Uniji nastopile, ko so se na trgu pojavili različni sevi oziroma kombinacije sevov, ki so bili označeni z izrazom »probiotik« brez znanstvenih dokazov o njihovem koristnem učinku na gostitelja. To je predstavljalo izkoriščanje izraza »probiotik«, ki naj bi ga večina ljudi razumela kot zdravstveno trditev. Zaradi tega je v Evropski Uniji prišlo do zakonsko omejene uporabe izraza probiotik tudi na tistih sevih, ki so imeli primerne znanstvene dokaze (Makinen in sod., 2012).

#### 2.1.2 Varnostne zahteve probiotikov

Uporaba probiotikov se v današnjem svetu povečuje, zato je pred njihovo uporabo ključno definirati njihovo varnost. Večina probiotikov ima dolgo zgodovino varne uporabe v fermentirani hrani in mleku (Butel, 2014). Najbolj znani probiotiki rodov *Lactobacillus*, *Bidifiobacterium*, in pa kvasovke vrste *Saccharomyces* so klasificirani v kategorijo organizmov z GRAS (Generally Regarded As Safe) statusom. Kljub znani varnosti, pa lahko v literaturi zasledimo primere infekcij s probiotiki, predvsem pri imunsko oslabljenih pacientih (Cannon in sod., 2005). Med naraščajočimi infekcijami je vedno več tudi fungemij s probiotično kvasovko *Saccharomyces boulardii* (Thygesen in sod., 2012). Patogenost je navadno povezana s specifičnim sevom in ne z vrsto. Zato je potrebno pred uporabo seve karakterizirati in določiti varnost. Za zagotavljanje nepatogenosti in varnosti mora sev slediti naslednjim točкам (Butel, 2014):

- Sev mora biti popolnoma identificiran (fenotipsko in genotipsko)
- Sev mora ostati stabilen med proizvodnjo in konzerviranjem
- Sev mora biti nepatogen
- Sev ne sme prenašati genov odpornih na antiboitike na druge kulture v črevesni mikrobioti.
- Sev ne sme povzročati infekcij zaradi translokacije iz notranjega v zunanji dela črevesja oziroma ne sme biti invaziven

Glede na točke, ki so nujno potrebne pri oceni varnosti probiotikov je bistvenega pomena, da se varnost probiotikov ne ocenjuje samo na eni predpostavki. FAO je v skladu s točkami začrtala smernice za odobritev probiotičnih sevov za uporabo v živilih (Amalaradjou in Bhunia, 2012), prikazano na sliki 1.



Slika 1: FAO/WHO smernice za odobritev probiotičnih sevov za uporabo v živilih (WHO/FAO, 2001).

### 2.1.3 Vrste probiotikov

Danes je znano, da črevesna mikrobiota igra pomembno vlogo pri človekovemu zdravju s pomočjo prehranskega, fiziološkega in imunološkega procesa, uživanje probiotikov pa lahko zmanjša motnje v črevesni mikrobioti (Kotzampassi in Giamarellos-Bourboulis, 2012). Koristni učinki probiotičnih sevov so specifični za posamezni sev. Pri izbiri je zato pomembno, da izberemo probiotične seve glede na njihovo toleranco na kisline, žolčne soli in njihovo zmožnost, da preživijo pot iz želodca v tanko črevo oziroma debelo črevo (Roy, 2011). Večina probiotičnih bakterij spada v rodovala *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Gre za gram pozitivne mlečnokislinske bakterije, ki igrajo pomembno vlogo pri črevesni mikrobioti pri ljudeh in živalih. Poleg tega pa je vedno več študij povezanih z raziskovanjem probiotičnega potenciala drugih mikroorganizmov kot so kvasovke (npr. *S. boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae* in *Candida intermedia*) (Hatoum in sod., 2012) in nekaterih ne-patogenih sevov *Escherichia coli* (Kotzampassi in Giamarellos-Bourboulis, 2012). Z naraščanjem zanimanja za probiotike, na trgu narašča tudi ponudba različnih probiotičnih pripravkov. Glede na mikrobiološko sestavo lahko probiotike delimo na bakterijske, kvasne in kombinirane (Hudournik in sod., 2008).

#### Probiotične bakterije:

Probiotične bakterije (prikazane v preglednici 1), se največkrat uporabljajo tako v prehranske kot tudi medicinske namene. Večinoma spadajo v rod mlečno kislinskih bakterij *Lactobacillus* in v rod *Bifidobacterium* (Floch in sod., 2011).

Preglednica 1: Priporočila za uporabo probiotičnih bakterij (Floch in sod., 2011).

Klinično stanje		Učinkovitost	Specifični sev probiotika
<b>Diareja:</b>			
Zdravljenje otroške diareje	A	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> , <i>Lactobacillus reuteri SD2112</i>	
Preprečevanje infekcijske diareje	B	<i>L. rhamnosus GG</i>	
Preprečevanje z antibiotiki povzročene diareje	A	<i>L. rhamnosus GG</i> , <i>Lactobacillus casei DN114 G01</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	
Preprečevanje z <i>C. difficile</i> povzročene diareje	B/C	<i>L. rhamnosus GG</i>	
<b>Kronično vnetna črevesna bolezen:</b>			
Ulcerozni kolitis			
Induciranje remisije	B	<i>Escherichia coli</i> Nissle	
Vzdrževanje remisije	A	<i>E. coli</i> Nissle	
Crohnova bolezen	C	<i>L. rhamnosus GG</i> , <i>E. coli</i> Nissle	
<b>Sindrom razdražljivega črevesja:</b>			
	B	<i>B. infantis</i> B5624	
	C	<i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> 299V	
<b>Imunski odziv</b>			
	A	<i>L. rhamnosus GG</i> , <i>L. acidophilus LAFT1</i> , <i>L. Plantarum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i>	
<b>Alergija</b>			
Atopijski dermatitis povezan z alergijo na kravje mleko			
Zdravljenje	A	<i>L. rhamnosus GG</i> , <i>B. lactis</i>	
Preventiva	A	<i>L. rhamnosus GG</i> , <i>B. lactis</i>	
<b>A - Priporočilo temelji na močnih, obširnih, pozitivnih, dobro izvedenih kontroliranih študijah v literaturi</b>			
<b>B - Priporočilo temelji na pozitivnih kontroliranih študijah, vendar pa je prisotnih tudi nekaj negativnih študij</b>			
<b>C - Priporočilo temelji na nekaterih pozitivnih študijah, vendar je pre malno raziskanih in obsežnih za vzpostavitev učinkovitosti "A" ali "B"</b>			

### Probiotične kvasovke:

Probiotične kvasovke so v nasprotju z bakterijskimi slabše zastopani v zdravstvu in prehrani. Kljub temu pa imajo določeni sevi npr. *S. boulardii* zelo dober probiotični potencial (Saad in sod., 2013). Od prve uporabe v začetku leta 1950 (McFarland in Bernasconi, 1993) se je uporaba probiotičnih kvasovk povečala predvsem za zdravljenje diarej. Poleg zdravljenja diarej so glavne prednosti probiotičnih kvasovk specifične antagonistične interakcije z entero-patogenimi mikroorganizmi kot so *Shigella*, *E. coli* in *Salmonela* ter njihova neobčutljivost na antibiotike, ki imajo v času zdravljenja negativni stranski učinek na

črevesno mikrobioto. Glavna slabost probiotičnih bakterij se kaže predvsem ob uporabi antibiotikov, ki poleg škodljivih mikroorganizmov uničijo tudi koristne (Temmerman in sod., 2003). V tem primeru je probiotična kvasovka primernejša izbira (Lourens-Hattingh in Viljoen, 2001). Slabo stran probiotičnih kvasovk predstavlja predvsem slabše poznavanje njihovih karakteristik in mehanizmov delovanja ter neprijetna tvorba ogljikovega dioksida kot produkta fermentacije (Dickinson in Schweizer, 2004). Probiotične kvasovke prav tako niso naravno prisotne v prebavilih (Hudournik in sod., 2008).

### **Kombinirani probiotiki (kefir):**

Kefir oziroma bolje rečeno kefirma zrna so kompleksna mešanica probiotičnih bakterij, kvasovk in polisaharidov, ki jih proizvaja ta mikrobna združba (Nalbantoglu in sod., 2014). S pomočjo kefirnih zrn lahko proizvajamo kefir, tradicionalno pičačo, ki jo pridobimo s fermentacijo mleka s pomočjo kefirnih zrn. V primerjavi s kvasnimi in bakterijskimi probiotiki, se kefirna zrna uporabljajo le v prehrani kot potencialno funkcionalno živilo. Za kefir se predvideva, da ima zaradi pestre probiotične sestave kefirnih zrn pozitivne učinke na zdravje posameznika ter preventivne lastnosti pred boleznimi (de Moreno de Leblanc in sod., 2007). Kljub pozitivnim učinkov, je še vedno malo znanega o probiotični sestavi kefirnih zrn in njihovi stabilnosti (Nalbantoglu in sod., 2014).

Probiotiki so lahko poleg mikrobiološke sestave klasificirani tudi glede na njihovo sposobnost, da kolonizirajo črevesje kot stalni ali prehodni probiotiki. Stali probiotiki so tisti, ki so naravno prisotni v človeškem prebavnem traktu, medtem ko so prehodni tisti, ki niso in pri potovanju skozi prebavni sistem ne ostanejo dalj časa v črevesju. Večina probiotikov samo prehodno kolonizira črevo, zato jih moramo jemati redno, dokler želim njihov učinek (Amalaradjou in Bhunia, 2012).

#### **2.1.4 Mehanizmi delovanja**

Mehanizmi delovanja probiotikov se razlikujejo med sevi in zato niso vedno dobro raziskani. Večino raziskav je narejenih *in vitro* ali pa na živalskih modelih. To je tudi eden od razlogov za umik zdravstvenih trditev o probiotikih s strani EFSA-e. Kljub temu so si raziskave enotne v nekaterih ključnih mehanizmih delovanja (Butel, 2014):

**Krepitev imunskega sistema gostitelja:** Ena izmed osnovnih nalog probiotikov je krepitev imunskega sistema gostitelja preko spodbujanja sinteze IgA (imunoglobulina A) v plazmatkah, ki se nahajajo v črevesni sluznici. Probiotiki prav tako vplivajo na citokinske odgovore in večje število makrofagov, naravnih celic ubijalk ter limfocitov T (Mičetić-Turk in Šikić-Pogačar, 2010).

**Kompeticija s patogenimi mikroorganizmi:** Probiotiki ustvarjajo kompeticijo s patogenimi mikroorganizmi za hrano in vezavna mesta na površini epitela (Butel, 2014).

**Sinteza snovi:** Probiotiki sintetizirajo snovi, kot so aminokisline, vitamini in maščobne kisline s katerimi vplivajo na sekrecijo sluzi, vzpostavitev normalne črevesne flore ter znižujejo pH (Butel, 2014).

**Konverzija lakteze:** Večina probiotičnih sevov je sposobna konverzije lakteze s pomočjo probiotičnih laktaz. Posledično je zato uživanje probiotikov povezano s sposobnostjo večjega vnosa lakteze. V realnosti se to kaže predvsem v tem, da ljudje z laktozno intoleranco lažje prenašajo jogurt, ki vsebuje probiotike, kot navadno mleko (Sanders, 2000).

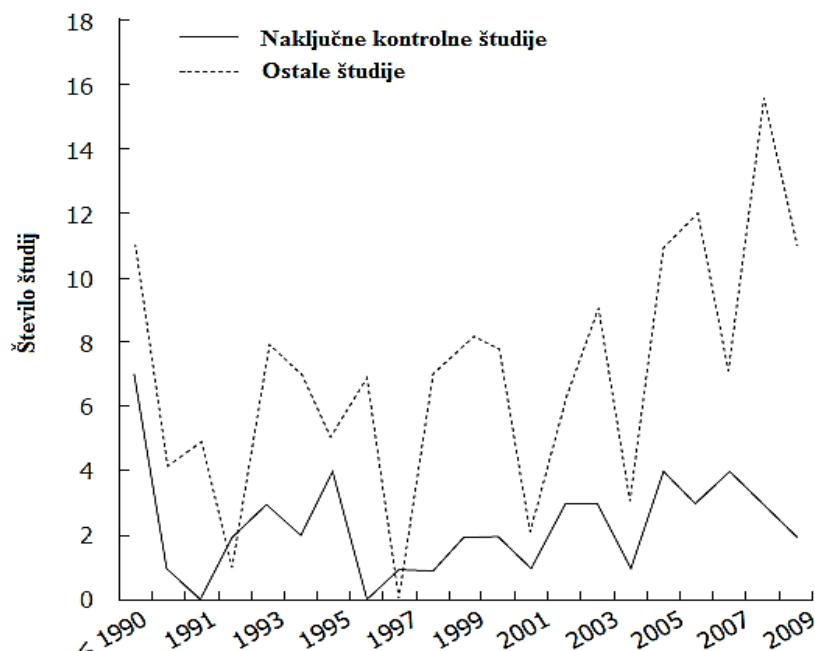
**Sinteza protimikrobnih in protiglivičnih snovi:** Nekateri probiotiki (mlečnokislinske bakterije), lahko proizvajajo različne bakteriocine ter protiglivične snovi (De Vuyst in Leroy, 2007).

**Zmanjšanje vnetnega odziva:** Probiotiki lahko zmanjšajo vnetne odzive s pomočjo regulacije citokinov in faktorja tumorske nekroze – TNF- $\alpha$  (Reid in sod., 2003).

## 2.2 PROBIOTIK *Saccharomyces boulardii*

### 2.2.1 Zgodovina

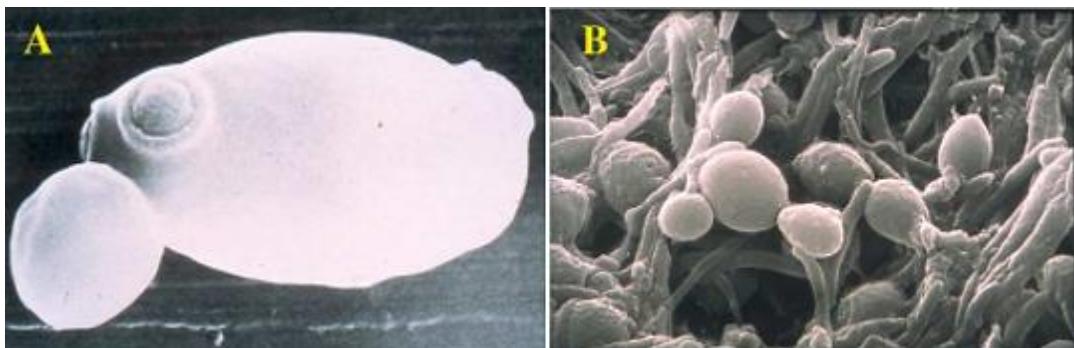
Probiotično kvasovko *S. boulardii* je leta 1920 odkril francoski mikrobiolog Henri Boulardi, ko je v Indokini iskal nov sev kvasovke, ki bi jo lahko uporabil v procesu fermentacije (McFarland, 2010). Boulardi je obiskal Indokino ravno v času izbruha kolere. Ob analizi vzorca obolelih je opazil, da so neokuženi ljudje uživali poseben čaj, ki je bil narejen iz zunanjé lupine tropskega ličija. Henri Boulardi je po opazovanju kot prvi izoliral sev, ki ga je poimenoval *S. boulardii*. Patent za kvasovko so leta 1947 kupili Biocodex Laboratories, ki so začeli kvasovko bolj podrobno raziskovati. Od odkritja pa vse do danes se je število raziskav in publikacij povezanih z raziskavami *S. boulardii* občutno povčalo (McFarland, 2010), kar je razvidno iz slike 2.



Slika 2: Frekvenca recenzij različnih publikacij v zvezi s probiotično kvasovko *S. boulardii* (McFarland, 2010)

## 2.2.2 Karakteristike

*S. boulardii* je ovalna probiotična kvasovka (prikazano na sliki 3), ki je sposobna rasti tako v anaerobnih kot tudi v aerobnih pogojih in zraste do 10 µm dolžine in 5 µm širine (Czerucka in sod., 2007). Celična stena kvasovke predstavlja do 30 % suhe teže celice. *S. boulardii* uspešno raste pri nizkih pH vrednostih ter optimalno pri temperaturi 37 °C (Czerucka in Rampal, 2002). Kvasovka zelo dobro raste predvsem v gastrointestinalnem traktu, kjer ji sposobnost rasti pri nizkem pH ter toleranca na žolčne kisline daje prednost pred drugimi potencialno patogenimi mikroorganizmi (McFarland, 2010). Genom same kvasovke je bil pred kratkim podrobnejše raziskan s čimer je bila potrjena podobnost probiotične kvasovke *S. boulardii* s pekovsko kvasovko *S. cerevisiae*. Analiza sekvene genoma *S. boulardii* vsebuje 11,400,000 baznih parov (Khatri in sod., 2013).



Slika 3: Elektronsko mikroskopska slika kvasovke *S. boulardii* (A). Sleplo črevo miši 3h po zaužitju 30 mg *S. boulardii* (B) (Czerucka in Rampal, 2002)

## 2.2.3 Identifikacija

Rezultati številnih taksonomskih študij so pokazali, da je *S. boulardii* sev kvasovke *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle in sod., 2005). Prav tako *S. boulardii* ni mogoče prepoznati kot svojo vrsto s trenutnimi taksonomskimi ključi na osnovi katerih kvasovka spada v vrsto *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle in sod., 2005). Kljub temu je mogoče kvasovko *S. boulardii* ločiti od ostalih sevov *S. cerevisiae* glede na njen probiotični potencial, njeno ne zmožnost uporabe galaktoze ter produkcije askospor. Zaradi navedenih razlogov nekateri znanstveniki menijo, da bi morala biti probiotična kvasovka obravnavana kot svoja vrsta (van der Aa Kuhle in Jespersen, 2003). Prav tako so z nekaterimi študijami natančneje z mikrosatelitnim polimorfizmom dokazali vzorec na podlagi katerega je moč razlikovati med *S. boulardii* in *S. cerevisiae* (van der Aa Kuhle in Jespersen, 2003). Poleg mikrosatelitnega polimorfizma obstaja tudi analiza RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) s pomočjo katere je možno razlikovati med sevi *S. boulardii* in *S. cerevisiae* (Mitterdorfer in sod., 2002), kot tudi razlikovanja na podlagi elektroporetskih kariotipov med *S. boulardii* v primerjavi s *S. cerevisiae* (Cassone in sod., 2003). Zaradi nasprotuječih si rezultatov raziskav se v praksi trenutno uporablja ime *S. boulardii* (nom. nud) (Vaughan-Martini in Martini, 1998). *Nom.nud.* (*nomen nudum*) je latinski izraz, ki označuje »nago ime«. Izraz se uporablja predvsem za vrste, ki izgledajo enako kot z znanstvenim imenom opredeljene vrste v našem primeru *S. cerevisiae*. Za te vrste s to označbo je značilno, da so v postopku pridobitve znanstvenega imena, vendar ker zaenkrat še ne obstaja objava z natančnim opisom vrste ima vrsta nago ime, ki ne more biti sprejeto glede na trenutne standarde nomenklature (ICZN, 2014).

## 2.2.4 Delovanje

Glavni mehanizmi delovanja probiotične kvasovke *S. boulardii* (prikazano na slikah 4 in 5).

Inhibicija aktivnosti bakterijskih patogenih produktov: *S. boulardii* proizvaja serinske proteaze, ki cepijo toksin A in B (prikazano na sliki 4) patogene bakterije *C. difficile* (Im in Pothoulakis, 2010).

Povečan imunski odziv: Probiotična kvasovka stimulira produkcijo protiteles proti toksinom A patogene bakterije *C. difficile* (Im in Pothoulakis, 2010).

Modifikacija signalnih proti, ki so vključene v vnetne in nevnetne bolezni: *S. boulardii* inhibira signalne poti jedrnega faktorja kapa B (NF- $\kappa$ B) in z mitogenom aktivirane protein-kinaze, ki vodijo v sintezo pro-vnetnih citokinov. Poleg tega pa stimulira proti-vnetne molekule kot je npr. peroksizomni proliferator aktivirani receptor gama (PPAR- $\gamma$ ) (Im in Pothoulakis, 2010).

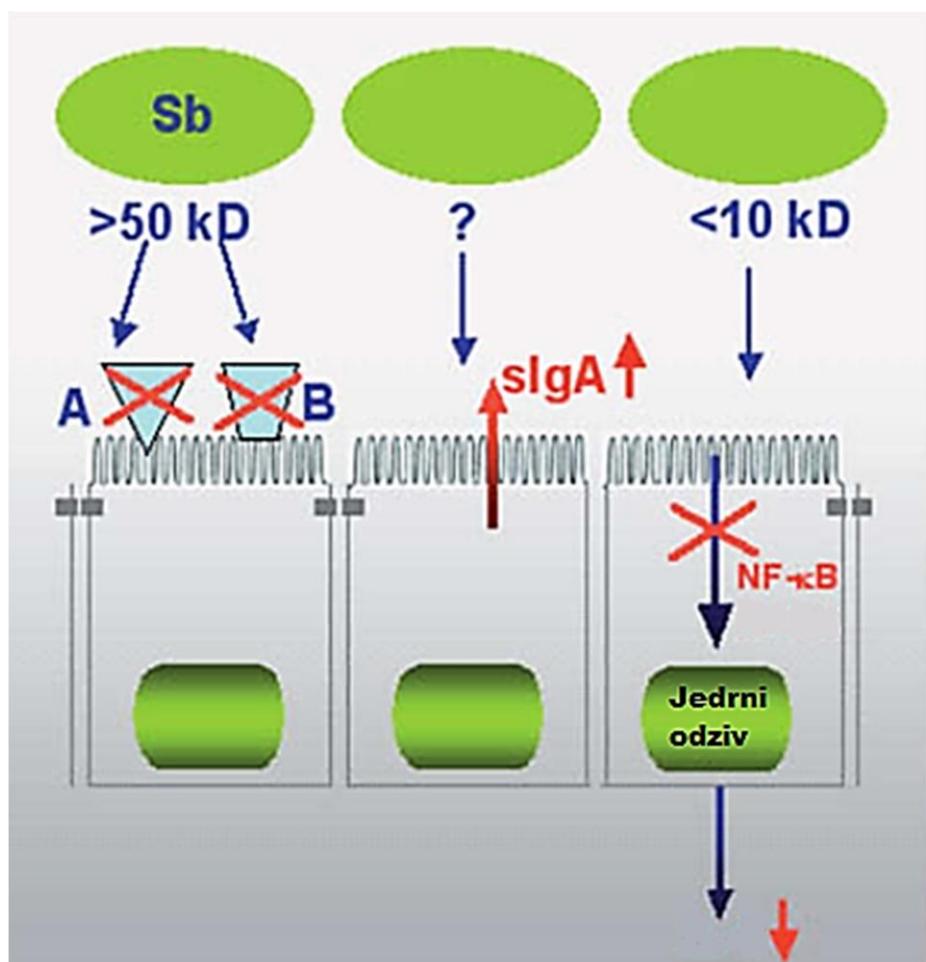
Vzdrževanje celične integritete oz. funkcij celične bariere: *S. boulardii* s tekmovanjem za vezavna mesta v črevesju zavira adhezijo in razrast patogenih mikroorganizmov na črevesnem epiteliju ter tako zavira poškodbo teh organizmov (Im in Pothoulakis, 2010).

Koflokulacija s patogenimi bakterijami: Probiotična kvasovka nase veže nekatere patogene bakterije (*E. coli* in *S. typhimurium*), ki se vežejo oz. adherirajo na površje *S. boulardii* (lektinski receptorji) namesto na črevesne receptorje, kar omogoča hitrejšo izločitev patogenih bakterij iz telesa (Tiago in sod., 2012).

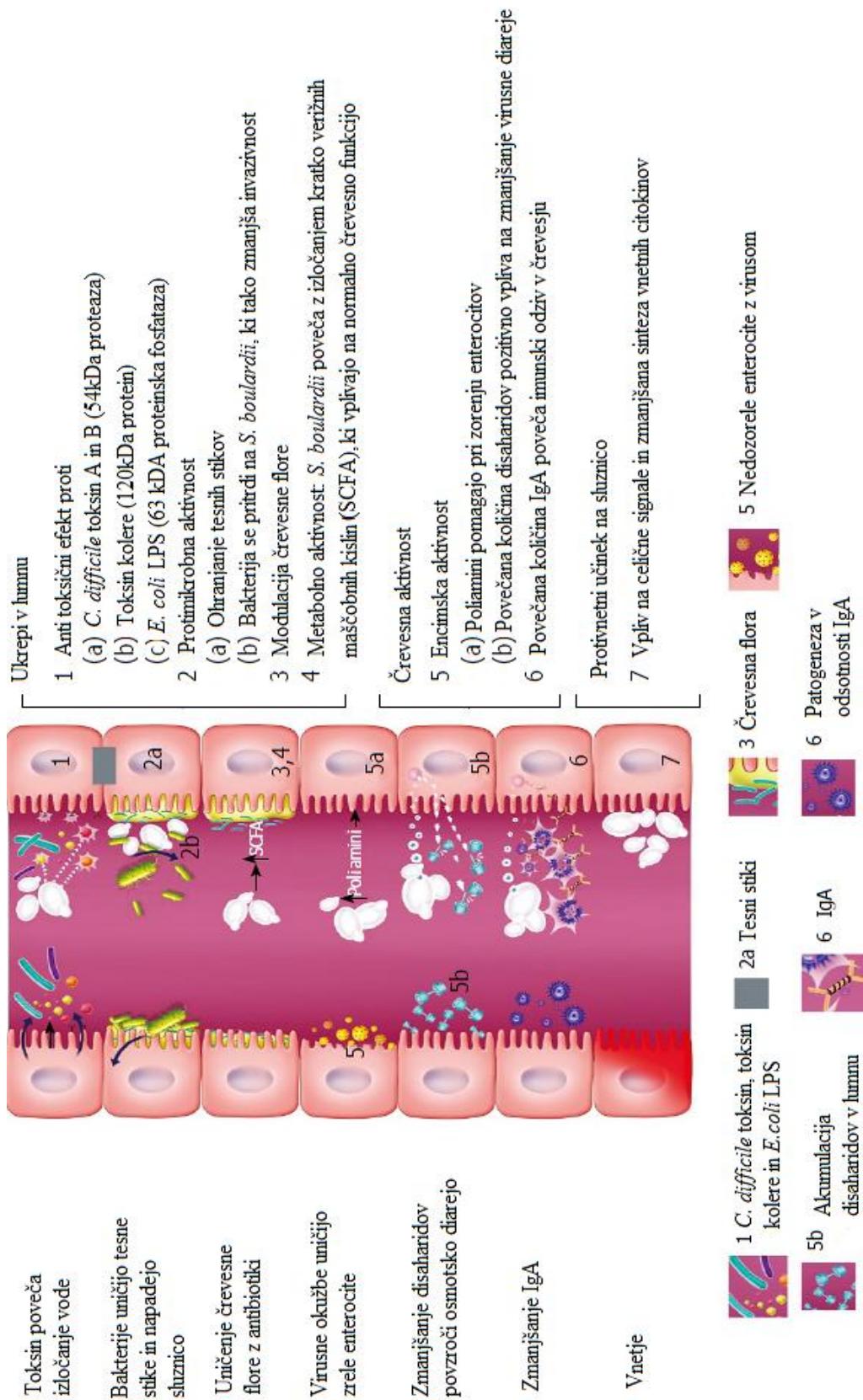
Vpliv na celično proliferacijo: *S. boulardii* z vezavo na tarčna mesta v črevesju vpliva na normalno celično proliferacijo. V primeru raka debelega črevesja blokira receptor za epidermalni rastni faktor (EGFR), ter tako blokira z EGF inducirano proliferacijo in stimulira apoptozo (Im in Pothoulakis, 2010).

Izboljšanje biostrukture fecesa: *S. boulardii* ugodno vpliva na izboljšanje biostrukture fecesa pri bolnikih z diarejo s preprečevanjem izločanja vode in elektrolitov ter povečevanjem števila disaharidov, ki se tako lažje razgradijo v monosaharide in se absorbirajo v kri (Im in Pothoulakis, 2010).

Vpliv na sekrecijo imunoglobulina A (IgA): Nedavne raziskave potrjujejo, da lahko *S. boulardii* vpliva na sekrecijo imunoglobulina A (IgA) (Rodrigues in sod., 2000) *S. boulardii* tako stimulira sintezo immunoglobulina A in proizvaja majhen (<10kDa) faktor, ki inhibira vnetno pot (Im in Pothoulakis, 2010).



Slika 4: Mehanizem delovanja proteaze (>50 kD) kvasovke *S. boulardii* (Sb), ki cepi toksin A in B patogene bakterije *C. difficile* ter proizvodnja majhnega (<10 kD) faktorja, ki inhibira vnetno pot (Im in Pothoulakis, 2010).



Sljika 5: Shema črevnega trakta ter različnih mehanizmov delovanja *S. boulardii* (Bassetti in sod., 1998; Riquelme in sod., 2003; McFarland, 2010)

## 2.2.5 Uporaba

Probiotična kvasovka *S. boulardii* se uporablja predvsem za (Floch in sod., 2011):

- Zdravljenje in preprečevanje akutne infekcijske diareje
- Zdravljenje in preprečevanje z antibiotiki povročenih diarej
- Zdravljenje in preprečevanje z *C. difficile* povzročenih diarej
- Podporno terapijo pri zdravljenju vnetne črevesne bolezni (Crohnova bolezn)

## 2.3 GLIVNE OKUŽBE

Glivne okužbe oziroma mikoze delimo glede na njihovo mesto delovanja na:

- Površinske glivne okužbe ali dermatomikoze. V to skupino spadajo predvsem glivne okužbe na površini kože (Hubbard in sod., 1985)
- Podkožne okužbe in glivne okužbe sluznic. V to skupino spadajo glivne okužbe v mišicah, sluznici, usnjici podkožnega tkiva... (Chaya in Pande, 2007).
- Sistemske glivne okužbe ali fungemije. V to skupini prednjačijo predvsem glivne okužbe v krvnem obtoku in različnih tkivih (Bicanic in Harrison, 2014).

Na svetu je trenutno poznanih 1,5 milijona različnih vrst gliv, od katerih jih je okoli 300 odgovornih za okužbe pri človeku (CDC, 2014).

### 2.3.1 Statistika glivnih okužb

Po statističnih podatkih o glivnih okužbah na svetu prevladujejo površinske glivne okužbe oziroma natančneje kožne okužbe. Te so bile leta 2010 uvrščene kar na 4. mesto po pogostosti okužb. Med kožne glivne okužbe uvrščamo glivne okužbe kože, las in nohtov, letno pa naj bi te okužbe prizadele okoli milijardo ljudi (Hay in sod., 2014).

Med podkožnimi glivnimi okužbami prevladujejo oralna, požiralnična in vulvovaginalna kandidoza. Med podkožnimi glivnimi okužbami oralna kandidoza prizadane okoli 13,3 milijona ljudi po svetu od tega kar 90 % bolnikov s HIV. Požiralna kandidoza prizadene okoli 3 milijone ljudi od tega 20 % bolnikov s HIV (Buchacz in sod., 2010), medtem ko vulvovaginalna kandidoza prizadene okoli 80 milijonov žensk letno (Sobel, 2007).

Kljub visokemu številu površinskih glivnih okužb, v zadnjih letih vedno večji problem predstavlja naraščanje sistemskih glivnih okužb. Problem invazivnih sistemskih glivnih okužb, predstavlja predvsem občutno večja stopnja smrtnosti v primerjavi s površinskimi glivnimi okužbami (Lass-Flörl, 2009). Med invazivnimi smrtno nevarnimi glivičnimi infekcijami prevladujejo kandidemije in aspergiloze. Stopnja smrtnosti pri teh infekcijah v Evropi je odvisna predvsem od vrste seva, geografske lokacije in karakteristike pacienta. Splošno pa se stopnja smrtnosti za kandidemijo giblje med 28-59 %, za aspergiliozo pa med 38-80 % (Lass-Flörl, 2009).

Infekcije s *Candido* prizadenejo približno 2-26/100,000 ljudi (Sobel in sod., 2011). Bolezen prizadene predvsem paciente po operaciji v intenzivni negi, ter paciente z odpovedjo ledvic, ki potrebujejo dializo (Zilberberg in sod., 2008). Poleg infekcij s *Candido* je tudi invazivna aspergiloza odgovorna za vse večje število smrti (Chen in sod., 2013). Kljub zdravljenju letno več kot 50 % patientov umre zaradi posledic invazivne aspergiloze (Bulpa in sod.,

2007). Med glavne invazivne glivne bolezni spadata še kriptokokni meningitis in pneumocistična pljučnica (Park in sod., 2009), katere smrtnost se v ZDA in UK giblje med 10-30 % (Teshale in sod., 2007).

### 2.3.2 Primerjava splošnih in imunooslabljenih pacientov

Na naraščajoče število sistemskih glivnih okužb vplivajo različni faktorji kot so uporaba imunosupresivnih agentov in antibiotikov širokega spektra delovanja. Z napredkom medicine se veča število pacientov z oslabljenim imunskim sistemom, ter s tem večje število okužb. Izboljšana medicinska oskrba je v zadnjem desetletju občutno prispevala k daljši življenjski dobi kritično bolnih pacientov, kar pa je po drugi strani dodatno prispevalo k večji izpostavljenosti pacientov sistemskim glivnim okužbam. V populacijo, ki je najbolj izpostavljena sistemskim glivnim okužbam spadajo bolniki z različnimi transplantacijami, bolniki s HIV, bolniki po operacijah, bolniki z opeklinami oziroma predvsem imunooslabljeni pacienti (Lass-Flörl, 2009). Imunsko oslabljeni pacienti imajo večjo incidenco z glivnimi okužbami od ostalih zaradi dolgega zdravljenja v bolnišnicah, kemoterapije ter večje uporabe imunosupresivov, ki zavirajo imunski sistem. Večja uporaba antibiotikov omogoča potencialno patogenim glivam, da se znebijo kompeticije bakterij v črevesju, lažje vstopijo v krvni obtok in tam dalj časa tudi ostanejo (Almirante in sod., 2006). Dodatno težavo pri sistemskih glivnih okužbah predstavlja intravenski kateter, preko katerega imunooslabljeni pacienti pogosto prejemajo zdravila. Intravenski kateter naj bi bil razlog za več kot polovico vseh fungemij (Ben-Ami in sod., 2008).

### 2.3.3 Pregled glivnih okužb s kvasovko *S. cerevisiae*

V zadnjih letih pekovsko kvasovko *S. cerevisiae* znanstveniki vedno bolj opredeljujejo kot oportunističnega patogena, čeprav je bila kvasovka zadnjih 30 let smatrana kot nepatogena z GRAS statusom. Podatki iz literature kažejo, da so invazivne infekcije s kvasovko *S. cerevisiae* redke med glivnimi okužbami, kljub temu pa se njihova incidenca občutno povečuje od leta 1990 (Angoulvant in Hennequin, 2005). V literaturi lahko zasledimo kar nekaj okužb s *S. cerevisiae* (Tiballi in sod., 1995; de Llanos in sod., 2006b; Graf in Gavazzi, 2007). Specifične podatke o obolelosti je težko oceniti saj infekcije s *S. cerevisiae* pogosto nastanejo pri pacientih z velikim številom soobolenj. Iz poročil je mogoče sklepati, da kot v primeru kandidoz prevladujejo okužbe preko intravenskega katetra in okužbe povzročene z antibiotično terapijo. Tudi same okužbe z invazivnimi vrstami *Saccharomyces* se klinično ne razlikujejo od invazivnih okužb s *Candida*. Kvasovke tipa *Saccharomyces* bi tako lahko dodali na rastoči seznam novih glivnih patogenov (Angoulvant in Hennequin, 2005).

### 2.3.4 Pregled glivnih okužb s kvasovko *S. boulardii*

Terapija s *S. Boulardii* se uporablja pri velikem številu pacientov v Evropi za preprečevanje akutne diareje. Kljub temu, da se *S. boulardii* smatra kot varen bioterapevtski agent, število fungemij povzročenih z njim narašča (Hennequin in sod., 2000). *S. boulardii* lahko kljub pozitivnim učinkom v nekaterih primerih povzroči glivno infekcijo, ki lahko privede do fungemije (Boyle in sod., 2006). V literaturi lahko zasledimo, da se število fungemij povzročenih s *S. boulardii* povečuje, kar se kaže tudi v večjem številu poročil o okužbah. Poleg infekcij zaradi uživanja probiotika pri imunooslabljenih ljudeh lahko v literaturi zasledimo tudi primere prenosa probiotika iz pacienta, ki je bil na terapiji s *S. boulardii* na pacienta, ki ni bil (Cassone in sod., 2003). V tem primeru je fungemijo s *S. boulardii* povzročila okužba centralnega venskega katetra, kar je vodilo v sepso. Odstotek vseh

fungemij zaradi *Saccharomyces spp.* so znanstveniki v veliki francoski študiji (Piarroux in sod., 1999) ocenili na 3,6 % (16/437). Nadalje sta znanstvenika (Angoulvant in Hennequin., 2005) pri pregledu fungemij povzročenih s strani *Saccharomyces* ugotovila, da je *S. boulardii* odgovoren za približno 51,3 % fungemij s strani rodu *Saccharomyces* ter ga je največkrat mogoče izolirati iz krvi. *S. boulardii* bi bil tako glede na študije odgovoren za približno 2 % vseh glivnih infekcij. Kljub slabši virulenci od *S. cerevisiae* pa lahko zasledimo tudi primere smrti zaradi sepse pri čemer je bil *S. boulardii* edini izoliran mikroorganizem v krvi (Piarroux in sod., 1999). V primerjavi s pacienti, ki so okuženi s *S. cerevisiae* so pacienti okuženi s *S. boulardii* najpogosteje imunokompetentni in imajo boljšo prognozo (Angoulvant in Hennequin., 2005).

### **2.3.5 Razlogi za porast števila okužb s probiotično kvasovko *S. boulardii***

V večini primerov je vzrok za fungemijo s strani *S. boulardii* translokacija probiotične kvasovke iz črevesja v krvni obtok zaradi črevesnih bolezni. Dodatni problem predstavljajo daljše hospitalizacije pacientov ter vedno večja uporaba antibiotikov širokega spektra delovanja (prikazano v preglednici 2). Pomemben dejavnik za fungemije predstavlja tudi uporaba venskega katetra ter z njim neustrezna higiena ter parenteralno prehranjevanje (Hennequin in sod., 2000). Število fungemij s *S. boulardi* narašča tudi po zaslugi vedno večjega števila imunske oslabljenih bolnikov zaradi transplantacij, operacij, uporabe citotoksičnih preparatov ter imunosupresivov (Sodja in sod., 2009).

Preglednica 2: Klinične karakteristike 13 pacientov s fungemijo *S. boulardii* (Sb) (Hennequin in sod., 2000; Thygesen in sod., 2012).

Spol / Starost	Stanje	Parenteralna (P) ali enteralna (E)	Terapija z antibiotiki	Stalni kateter	Sb doza (mg/dan)	Čas od zaužitja Sb do fungemije (dan)	Protiglivična učinkovina	Prišotnost kulture v krvi ob stalnem katetu	Odstranitev katetra
M/33	Ulcerozni kolitis	E	da	da	1500	5	AmB+FCZ	ni podatkov	ni podatkov
M/14	Opeklne	E	da	da	2000	7	AmB+5-FC	ni podatkov	odstranjen
F/1	Podhranjenost	P	da	da	600	13	FCZ	prisotna (+/ +)	ni podatkov
M/49	Plijučnica	E	da	da	2000	4	FCZ	ni podatkov	ni podatkov
F/51	Okužba <i>C. difficile</i>	N	da	da	1000	18	AmB	ni podatkov	ni podatkov
F/78	COPD	E	da	da	1500	21	FCZ	ni podatkov	odstranjen
F/31	AIDS	P	ni podatkov	da	ni podatkov	ni podatkov	prisotna (+/ +)	odstranjen	odstranjen
F/36	AIDS	N	ni podatkov	da	ni podatkov	ni podatkov	ni podatkov	odstranjen	odstranjen
M/1.8	Prebavna atrezija	E	ni podatkov	da	1000	2	ni podatkov	ni podatkov	ni podatkov
M/2	Cistična fibroza	E	da	da	500	300	AmB	prisotna (+/-)	odstranjen
M/36	AIDS	P	da	da	1500	7	FCZ	prisotna (+/ +)	ni odstranjen
M/47	Odstranitev dela poziralnika	P nato E	da	da	2000	10	FCZ	prisotna (+/ +)	odstranjen
F/78	Želodčna razjeda	E	da	da	1500	53	brez	prisotna (+/ +)	ni odstranjen

### 2.3.6 Varnost uporabe *S. boulardii*

Kljub splošni varnosti kvasnega probiotika, uporaba le tega ni povsem brez tveganj. V poročilih iz literature (Kelesidis in Pothoulakis, 2011) navajajo, da *S. boulardii* lahko povzroči težave pri imunsko oslabljenih osebkih. Glavno težavo predstavlja s *Saccharomyces* povzročena fungemija, predvsem pri imunsko ogroženimi bolnikih, bolnikih s črevesnimi boleznimi ter pacientih, ki imajo prisoten stalen kateter (Kelesidis in Pothoulakis, 2011). Do danes lahko med literaturo najdemo okoli 100 primerov s *S. boulardii* povzročene fungemije. Izvor fungemije pa se pripisuje predvsem translokaciji probiotika v črevesju ali pa kontaminaciji katetra z rokami zdravnika osebja. Pri pacientih, ki potrebujejo *S. boulardii* se tako priporoča, da se potencialne koristne učinke *S. boulardii* dobro oceni za vsakega posameznika posebej. Prav tako je zaradi kontaminacije preko katetra priporočljivo, da zdravstveno osebje, ki dela s *S. boulardii* pripravi pripravek zunaj sobe pacienta po protokolu z uporabo rokavic. Priporočljivo je tudi, da se kateter v primeru pojava fungemije odstrani (Hennequin in sod., 2000).

### 2.4 VIRULENTNI DEJAVNIKI kvasovke *S. boulardii*

Dosedanje raziskave testiranja virulence na vrstah *S. cerevisiae* so pokazale, da imajo lahko nekateri sevi velik virulentni potencial (McCullough in sod., 1998). Glede na genetsko podobnost med *S. cerevisiae* in *S. boulardii* pa je mogoče sklepati na podobne virulentne dejavnike med vrstama. V literaturi obstajajo dokazi, da imajo lahko, v primerjavi z virulentnimi in nevirulentnimi sevi *S. cerevisiae*, nekateri izolati *S. boulardii* srednjo stopnjo virulence (Brass in Stevens, 1982). Kljub temu, da je virulenta *S. boulardii* skromna se pojavlja vprašanje uporabe potencialnega patogena kot terapevtskega agenta, še posebej pri imunsko oslabljenih pacientih. Dodatno skrb predstavlja dejstvo, da imajo nekateri sevi *S. boulardii* iz različnih serij različno stopnjo virulence, kar nakazuje na to, da so različne serije *S. boulardii* različne po genomske sestavi oz. genih, ki določajo virulenco (McCullough in sod., 1998). Virulentnih dejavnikov je veliko, zato sem v tem delu zajel le najpomembnejše za vrste *S. cerevisiae* in *S. boulardii*, ki imajo zelo omejen virulentni potencial.

Da lahko gliva povzroči bolezen pri osebku mora (Kurokawa in sod., 1998):

- Biti sposobna pritrditve oz. adhezije na epitel
- Biti sposobna povzročiti vnetje v črevesju ali vstopiti v gostiteljev krvni obtok
- Se uspešno podvajati v tkivu gostitelja
- Biti odporna na gostiteljev imunski sistem
- Biti sposobna poškodovati gostitelja

Uspešnost vseh teh 5 procesov je odvisna od različnih virulentnih faktorjev, ki jih gliva uporablja (Kurokawa in sod., 1998).

#### **2.4.1 Rast pri telesni temperaturi človeka (nad 37 °C)**

Mehanizmi patogeneze pri glivah niso tako dobro poznani kot pri bakterijah. V nasprotju z bakterijami je malo gliv lahko patogenih. Zaradi kompleksnosti odnosa med glivo in gostiteljem obstaja le malo virulentnih faktorjev, ki so bistveni za glivno virulenco. Kljub temu pa so nekatere lastnosti gliv velikokrat povezane s patogenezo. Sposobnost rasti pri visokih temperaturah 38-42 °C je ena izmed prvih lastnosti določanja potencialnega patogena (de Llanos in sod., 2006a). Rast pri temperaturi nad 37 °C je pri vrstah *Saccharomyces* eden izmed pomembnejših kriterijev virulence, ki razlikuje med kliničnimi in nekliničnimi sevi. Odpornost na temperaturne spremembe je povezana s sintezo proteinov toplotnega šoka (Kurokawa in sod., 1998). Rast in podvajanje gline nad temperaturo človeškega telesa je en izmed virulentnih faktorjev, ki je značilen za vse patogene glive (McCullough in sod., 1998). Kljub temu, da je sposobnost rasti pri višji temperaturi povezana z virulenco pa to ni edini determinirajoči faktor (de Llanos in sod., 2006a).

#### **2.4.2 Imunomodulacija**

Alfa-glukan je polisaharid v celični steni večine gliv in je povezan s povečano virulenco patogenih gliv, preko stimulacije imunskega sistema in makrofagov (Kurokawa in sod., 1998). Nekateri glivni ligandi lahko sprožijo imunski odziv kot je fagocitoza in produkcija citokinov (Yáñez in sod., 2009).

Antigeni, ki jih vsebujejo kvasovke v celični steni, tako sprožijo imunski odziv oz. vnetje kar lahko pripomore k virulenci. Znano je namreč, da celična stena kot zunanj struktura celice igra pomembno vlogo pri interakciji z gostiteljem (Yáñez in sod., 2009).

#### **2.4.3 Adhezija**

Adhezija na gostiteljevo tkivo je en izmed glavnih virulentnih dejavnikov oz. mehanizmov za začetek kolonizacije in procesa infekcije (Yáñez in sod., 2009). Do adhezije pride, ko glive proizvedejo molekule na celični steni, ki omogočijo adhezijo glive na tuge celice oz. tkiva. Adhezija kot mehanizem je kljub pomembnosti slabo raziskana (Kurokawa in sod., 1998). Poleg adhezije na epitel črevesja velik problem predstavlja tudi zelo velika adhezivnost na materiale kot so polistiren, polipropilen in polivinilklorid. Adhezivnost na materiale je pomembna pri pacientih, ki uporabljajo kateter iz omenjenih materialov, saj lahko kvasovke preko vezave na te, vstopijo v krvni obtok (Donowitz in sod., 2001).

#### **2.4.4 Invazivna rast**

Z izločanjem hidrolitičnih encimov, glivne celice pridobijo dostop do nutrientov v gostiteljevi celici preko degradacije strukturne bariere gostiteljeve celice. Sama poškodba gostiteljskih celic vpliva na viabilnost tkiva in omogoča glivi, da lažje vstopi v gostiteljsko celico in v gostiteljev krvni obtok (McCusker in sod., 1994).

Patogene glive lahko izločajo encime, ki so ključni za njihovo patogenezo. Pri glivah so ti encimi karakterizirani v 2 skupini (de Llanos in sod., 2006a):

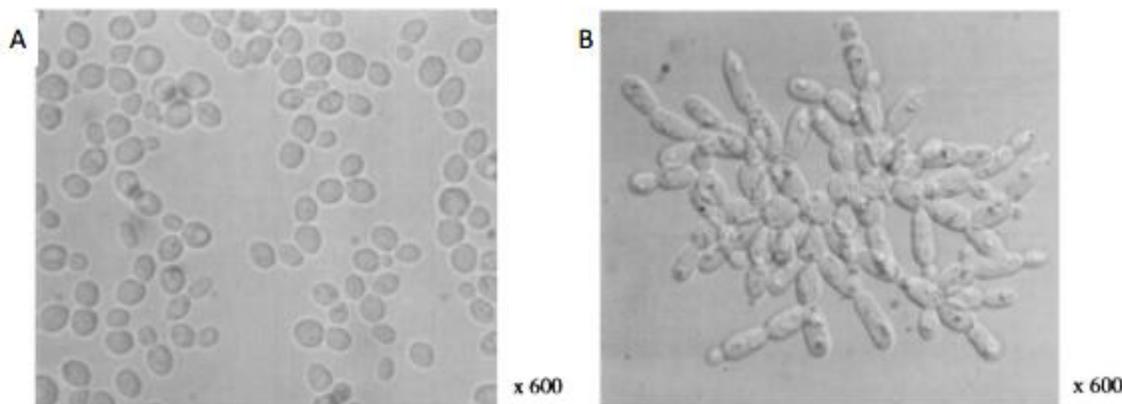
**Proteinaze:** Hidrolizirajo proteine in peptide

**Fosfolipaze:** Hidrolizirajo fosfolipide.

Proteinaze izločajo tako patogene kot nepatogene vrste *Saccharomyces* in zato niso povezane z virulentnimi faktorji. Drugače je s fosfolipazami, saj potencialni virulentni *Saccharomyces* sevi producirajo večjo stopnjo fosfolipaz kot nepatogeni sevi (de Llanos in sod., 2006a). Fosfolipaze razgrajujejo celične stene gostiteljskih celic in olajšajo adhezijo in invazijo glivnih celic (McCusker in sod., 1994).

Na invazivno rast kvasovk pomembno vpliva tudi bipolarna rast do katere pride zaradi pomanjkanja hranil (glukoza, dušik). Ob pomanjkanju hranil začne kvasovka rasti bipolarno (brstenje na nasprotnih polih), kar se odraža v usmerjeni rasti v podlago. Pri invaziji se kvasne celice podaljšajo in s pomočjo bipolarne rasti oz. spremembe brstenja iz aksialnega v bipolarno prodirajo v podlago s pomočjo sile (Roberts in Fink, 1994).

Kvasovkam *S. cerevisiae* lahko pri invazivnosti pomaga tudi strukturni dimorfizem (prikazano na sliki 6). *S. cerevisiae* lahko raste v dveh različnih oblikah. V enocelični obliki kvasovke ali pa v obliki večcelične pseudohifne oz. filamentozni oblik, ki omogoča *S. cerevisiae* lažjo adhezijo ter penetracijo v gostiteljsko celico (Robin, 2010).



Slika 6: Enocelična oblika kvasovke (A); Pseudohifna oblika (B) (Robin, 2010)

## 2.5 ODPORNOST NA PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE

Pri okužbah imajo glive zaradi evkarijontskega izvora zelo majhno število tarč na katere lahko delujejo protiglivične učinkovine brez da bi poškodovali gostiteljske celice (Zupan in sod., 2013b). Med protiglivičnimi učinkovinami prisotnimi na trgu jih največ deluje na pot biosinteze ergosterola, saj je ergosterol glavni sterol v celičnih membranah gliv in ni prisoten v celičnih stenah živali. Večino protiglivičnih učinkovin tako deluje na encim citokroma p450, ki je pomemben za biosintezo ergosterola (Anderson in sod., 2003). Kljub prisotnosti protiglivičnih učinkovin pa imajo nekatere glive razvite mehanizme, ki povečajo njihovo odpornost na delovanje teh (Lupetti in sod., 2002).

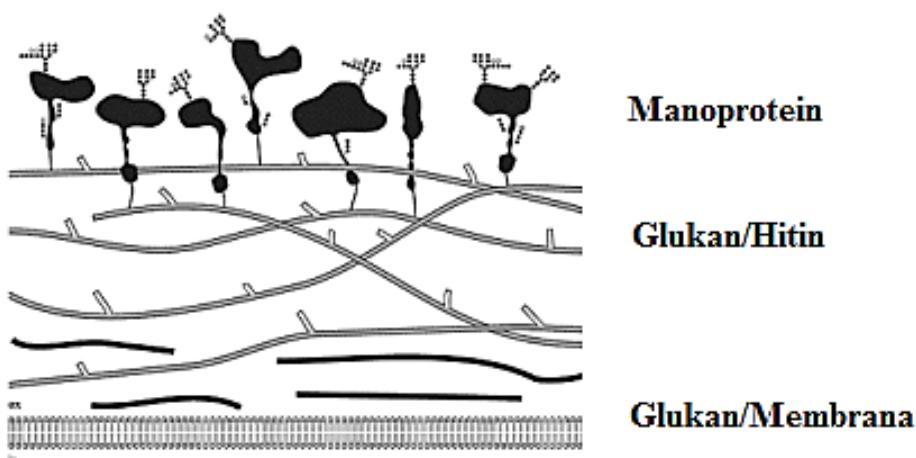
Do odpornosti na protiglivične učinkovine lahko pride zaradi naslednjih mehanizmov (Lupetti in sod., 2002; Anderson in sod., 2003):

- **Sprememba biosinteze sterola:** Vključuje zamenjavo drugih sterolov za ergosterol.
- **Povečana ekspresija tarčnega proteina:** Povečana ekspresija tarčnega proteina vpliva na zadostno encimsko aktivnost, kljub prisotnosti protiglivične učinkovine.
- **Povečano delovanje različnih izlivnih črpalk:** Povečano delovanje izlivnih črpalk zmanjša intracelularno koncentracijo protiglivične učinkovine.
- **Sprememba aminokislinske sekvence za tarčni protein:** Zmanjša afiniteto povezovanja za azole.

## 2.6 PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE

Glavni problem uporabe protiglivičnih učinkovin je ta, da imajo glivne celice veliko enakih tarčnih mest skupaj z evkarionskimi celicami. Zato je glavni namen protiglivičnih učinkovin predvsem najti taka tarčna mesta, ki so prisotna v glivnih celicah in odsotna v evkarionskih (Myers, 2006). Celična stena gliv (prikazana na sliki 7) je eden od unikatnih organelov, ki ustreza selektivni toksičnosti. Kljub temu, da ima vsaka gliva drugačno postavitev biokemijskih komponent, je njihova groba struktura podobna (Ghannoum in sod., 1999). Obstajajo trije različni mehanizmi delovanja protiglivičnih učinkovin (Myers, 2006):

- **Motnje celičnih membran:** Protiglivične učinkovine motijo celično membrano preko ustvarjanja por, ki povzročijo da membrana postane prepustna, s tem da se vežejo na ergosterol (npr. amfotericin B), ali pa z inhibicijo ergosterolne biosinteze (azoli).
- **Inhibicija celične delitve:** Protiglivične učinkovine lahko tarčno delujejo na mikrotubole pri celični delitvi (npr. flucitozin).
- **Inhibicija formacije celične stene:** Uspešnost teh protiglivičnih učinkovin je zaenkrat še manjša vendar imajo večji potencial. Večina učinkovin deluje na sintezo B-glukana (npr. kaspofungin).

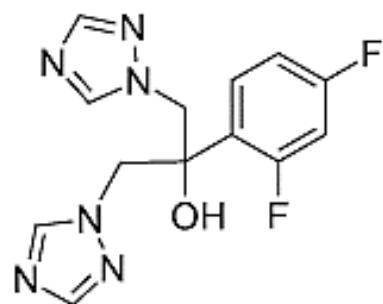


Slika 7: Ureditev biomolekularnih komponent celične stene (Myers, 2006)

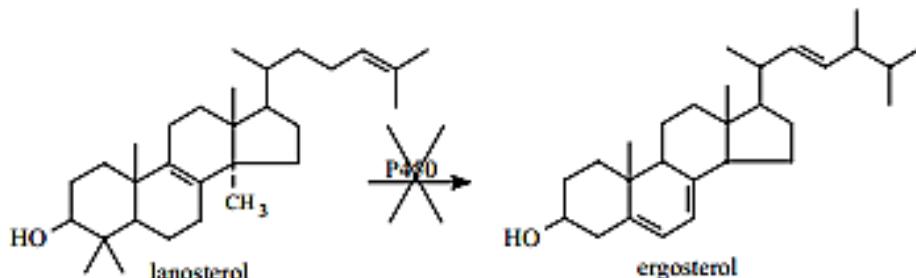
### 2.6.1 Pregled protiglivičnih učinkovin in mehanizmi delovanja

#### ▪ Flukonazol

Azolne protiglivične učinkovine so največja skupina sintetičnih protiglivičnih učinkovin. Poznanih je okoli 20 različnih vrst. Flukonazol (slika 8) spada med triazole, ki inhibirajo delovanje lanosterol 14 alfa-demetylaze (citokrom P450) encima, ki je odgovoren za pretvorbo lanosterola v ergosterol (slika 9) (Paulus in sod., 1994; Pfizer, 2014). Inhibicija poteka tako, da osnovni dušik v azolnem obroču tvori močno vez z železom hema glivnega citokroma P450 ter tako preprečuje vezavo med substratom in kisikom. Sama inhibicija vpliva na akumulacijo sterolov, ki so odgovorni za spremjanje oblike ter fizičnih lastnosti membrane, to pa vpliva na večjo permabilnost membrane (Shalini in sod., 2011). Flukonazol se lahko zaužije v obliki tablet ali suspenzije za zdravljenje glivnih infekcij ust, grla, trebuha, pljuč, krvi in drugih organov. Prav tako se uporablja kot preventivna terapija pri kemo in radioterapiji (Ghannoum in sod., 1999).



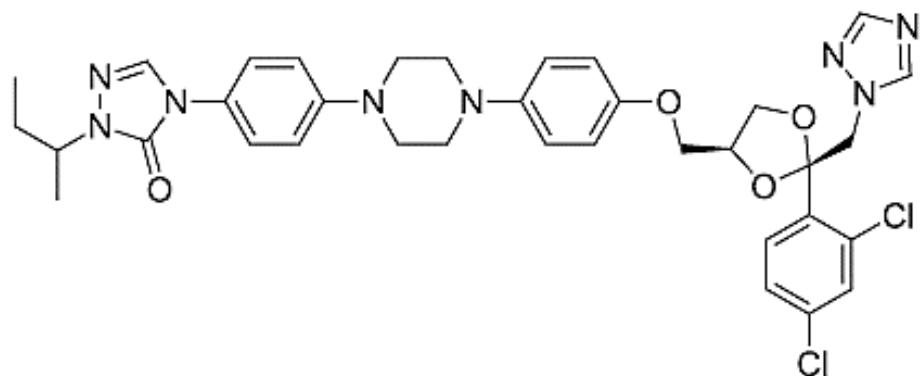
Slika 8: Struktorna formula flukonazola (Shalini in sod., 2011)



Slika 9: Nezmožnost pretvorbe lanosterola v ergosterol (Myers, 2006)

#### ▪ Itrakonazol

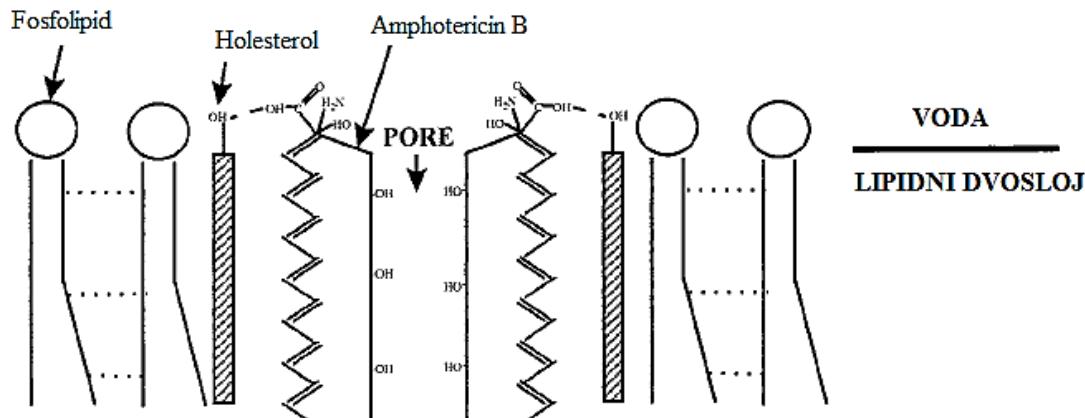
Itrakonazol (slika 10) prav tako spada med triazole in deluje enako kot flukonazol. Itrakonazol navadno zaužijemo oralno s kapsulo za zdravljenje glivnih okužb, ki se začnejo v pljučih in se nato razširijo skozi telo (Ghannoum in sod., 1999). Uporablja se posredno tudi za zdravljenje glivnih okužb nohtov. Itrakonazol in flukonazol spadata med najmočnejša, najmanj toksična efektna sredstva za oralno terapijo proti različnim sistemskim glivnim okužbam (Myers, 2006).



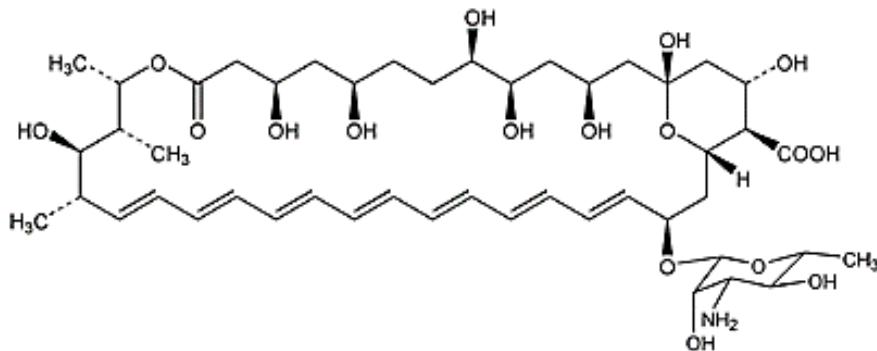
Slika 10: Strukturna formula itrakonazola (Shalini in sod., 2011)

#### ■ Amfotericin

Amfotericin B (slika 12) spada med polienske protiglivične agente in se veže na ergosterol v celični membrani gliv kar povzroči, da membrana postane prepustna (prikazano na sliki 11). Zaradi veče učinkovitosti v primerjavi s triazoli se uporablja pri resnih, življenjsko ogroujočih glivnih infekcijah (Myers, 2006). Amfotericin B spada med nevarne protiglivične učinkovine, saj ima zelo slabo selektivnost med ergosterolom in holesterolov v sesalskih celicah in zato povzroča številne hude stranske učinke. Kljub temu lahko pride do odpornosti na amfotericin B zaradi zmanjšane produkcije sterolov ali spremenjene sestave sterolov, vendar je ta pojav redek. Odpornost večinoma kažejo nekatere naravno odporne vrste (Ghannoum in sod., 1999). Amfotericin B bolnik prejme intravenozno z infuzijo v točno predpisanih odmerkih, snov pa se iz telesa izloča z urinom po daljšem času (Myers, 2006).



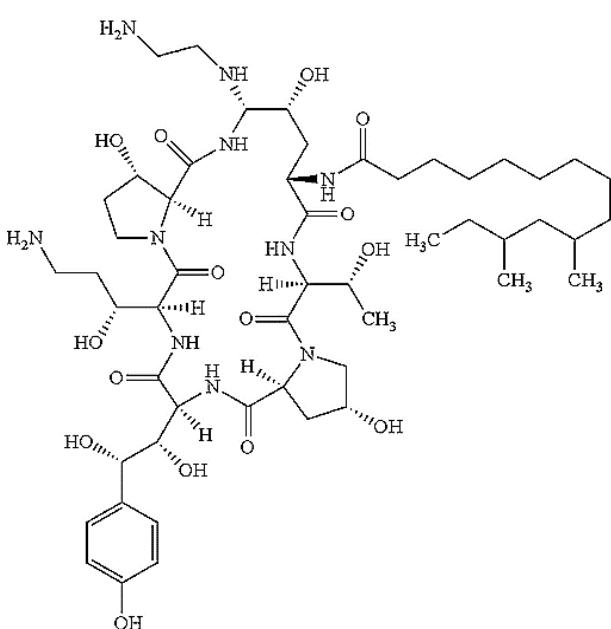
Slika 11: Interakcija med amfotericinom B in holesterolom v fosfolipidnem dvosloju (Ghannoum in sod., 1999)



Slika 12: Strukturna formula amfotericina B (Myers, 2006)

#### ■ Kaspofungin

Kaspofungin (slika 13) je protigliivična učinkovina, ki se uporablja predvsem za zdravljenje aspergiloze, pri pacientih, ki so neodzivni ali intolerantni na druge protigliivične terapije. Prav tako je zelo učinkovit tudi proti invazivnim vrstam *Candida* (Myers, 2006). Je polsintetični lipopeptid. Kaspofungin je inhibitor (1,3)-D-glukan sinteze. Tako z motenjem formacije beta-glukana v celični steni vpliva na zdravljenje saj je beta-glukan nujen za strukturno integriteto celične stene (Myers, 2006).



Slika 13: Strukturna formula kaspofungina (Myers, 2006)

## 2.6.2 Modulatorni učinki

Do glivnih okužb večinoma prihaja pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom. Ti bolniki tekom zdravljenja poleg protiglivičnih učinkovin prejemajo tudi številne imunomodulatorne učinkovine (npr., FK506, MPA), ter v primeru bakterijskih okužb antibiotike. Te učinkovine imajo lahko pomembne modulatorne učinke s protiglivičnimi učinkovinami in tako pomembno vplivajo na zdravljenje bolnikov (Low in Rotstein, 2011).

### ▪ Antibiotiki (Vankomicin)

Vankomicin je glavni antibiotik, ki se uporablja za zdravljenje s *C. difficile* povzročene diareje. Do okužbe navadno pride zaradi pretirane uporabe antibiotikov širokega spektra, ki omogočajo rast odpornih bakterij v črevesju, kar lahko pripelje do hujše diareje. Antibiotik vankomicin se uporablja samo za zdravljenje bakterijskih infekcij črevesja, saj se ne absorbira v telo ampak ostane v črevesju, kjer deluje na patogene bakterije (Cohen in sod., 2010).

### ▪ Imunosupresiv FK506

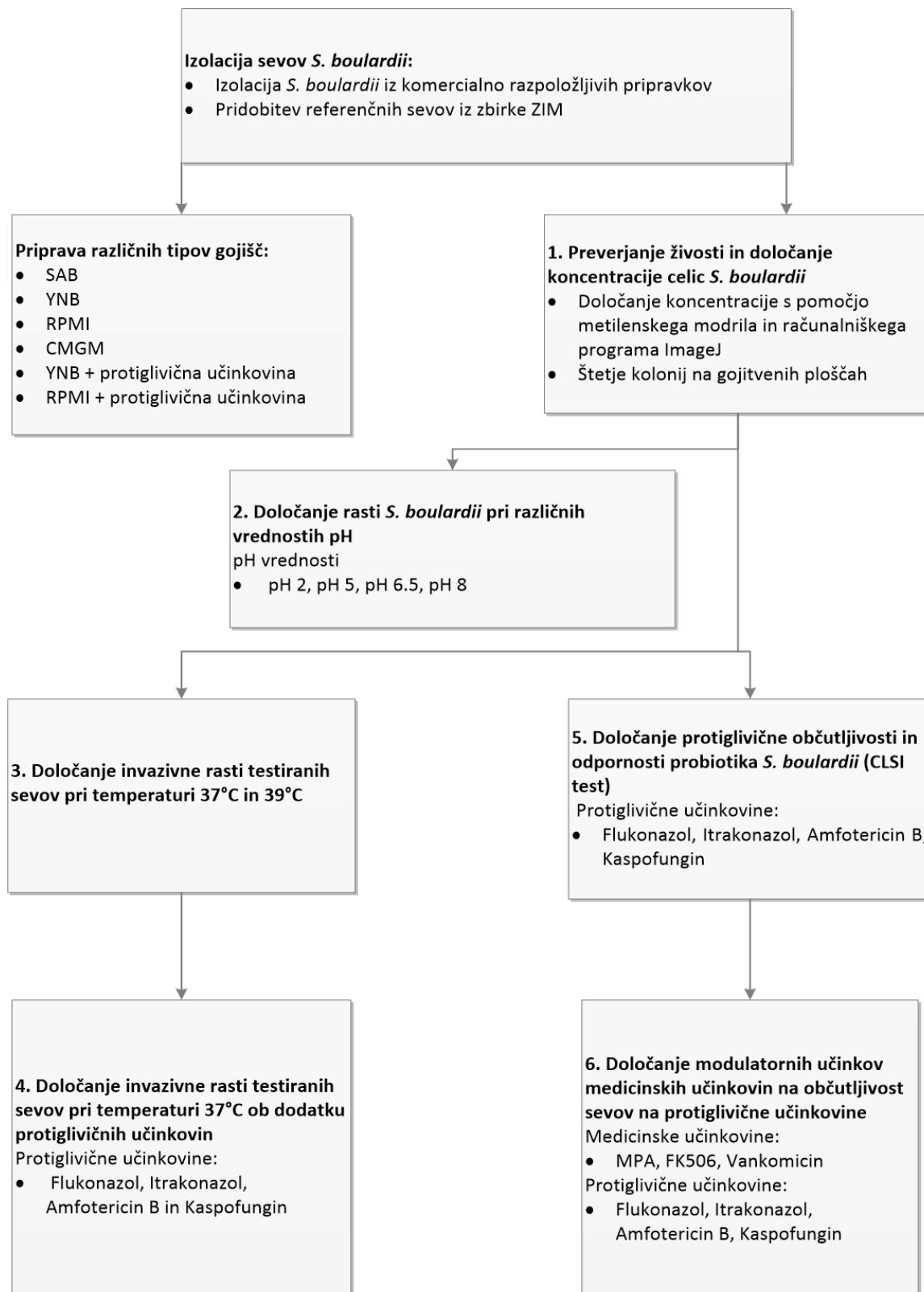
Imunosupresiv FK506 (Tacrolimus) se pogosto uporablja v medicini pri transplantacijah z namenom zmanjšanja delovanja imunskega sistema pacienta. Spada med inhibitorje kalcineurina. Aktivacija T-celic imunskega sistema namreč poveča intracelularni kalcij, ki aktivira kalcineurin. Le ta nato defosforilira transkripcijski faktor NF-AT, ki poveča aktivnost izražanja genov za IL-2 ter druge vnetne citokine (Liu in sod., 1991).

### ▪ Imunosupresiv MPA

Imunosupresiv MPA (mikofenolna kislina) je močan imunosupresiv, ki se pogosto uporablja v medicini, največ pri presaditvah ledvic. MPA zavira razvoj limfocitov B in T preko inhibicije inozin 5-monofosfat dehidrogenaze (IMPDH), encima, ki je vključen v sintezo novih purinskih nukleotidov ter tako sintezo DNK (Bren in Kandus, 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 HODOGRAM POSKUSA



Slika 14: Hodogram poskusa

### 3.2 MATERIALI

Različne komercialne pripravke *S. boulardii* smo skupaj z referenčnimi sevi nacepili na gojišča, ter jih nato uporabili za določanje invazivne rasti, rasti pri različnih vrednostih pH, določanju protigliivične občutljivosti ter testiranju modulatornih učinkov medicinskih učinkovin na občutljivost sevov na protigliivične učinkovine.

#### 3.2.1 Mikroorganizmi

V magisteriju smo uporabili seve (prikazane v preglednici 3) izolirane iz komercialno razpoložljivih probiotikov na trgu (PRO1-5), sev izoliranega pekovskega kvasa (PEK1) ter referenčne seve iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Biotehniške fakultete v Ljubljani:

Preglednica 3: Sevi uporabljeni v magistrskem delu ter njihov namen

Vrsta	Izolat	Izvor	Namen
<i>Saccharomyces boulardii</i>	PRO1	Komercialno razpoložljiv probiotik	Probiotik
<i>Saccharomyces boulardii</i>	PRO2	Komercialno razpoložljiv probiotik	Probiotik
<i>Saccharomyces boulardii</i>	PRO3	Komercialno razpoložljiv probiotik	Probiotik
<i>Saccharomyces boulardii</i>	PRO4	Komercialno razpoložljiv probiotik	Probiotik
<i>Saccharomyces boulardii</i>	PRO5	Komercialno razpoložljiv probiotik	Probiotik
<i>Saccharomyces boulardii</i>	ZIM 2263	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Probiotik
<i>Saccharomyces boulardii</i>	ZIM 2264	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Probiotik
<i>Saccharomyces boulardii</i>	ZIM 2265	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Probiotik
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PEK1	Komercialno razpoložljiv pekovski kvass	Genetska podobnost s <i>S. boulardii</i>
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	ZIM 2403	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Genetska podobnost s <i>S. boulardii</i>
<i>Candida krusei</i>	ZIM 603	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Patogen sev
<i>Candida glabrata</i>	ZIM 2344	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Patogen sev
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZIM 2260	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Patogen sev
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	ZIM 2460	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Alternativni probiotik
<i>Kluyveromyces lactis</i>	ZIM 2408	Zbirka industrijskih mikroorganizmov	Alternativni probiotik

Sevi so bili hranjeni v krionepruvetah v raztopini za hranjenje kvasovk na -80 °C (preglednica 4).

Preglednica 4: Raztopina za hranjenje kvasovk

Raztopina za hranjenje kvasovk na -80 °C (200 ml)		
Sestavina	%	Količina
Glicerol	10	25 g
NaCl	1	2 g
Tween 20	1	10 g
H <sub>2</sub> O	/	190 ml

### 3.2.2 Gojišča

Kvasovke smo kultivirali na gojišču SAB (Sabourand dextrose broth), ki je priporočljiv za selektivno kultivacijo kvasovk, plesni ter v kislem okolju rastučih bakterij. Revitalizacija sevov po odmrzovanju je prav tako potekala na SAB gojišču pri 28 °C. Za test invazivnosti smo v skladu s protokolom uporabili gojišče YNB (Yeast nitrogen base). V skladu s protokolom za test protiglivične občutljivosti standarda CLSI (CLSI, 2008; CLSI, 2010) smo uporabili medij RPMI. Za testiranje rasti pri različnih vrednostih pH pa smo uporabili CMGM (Complex colonic model growth medium) gojišče, kateremu smo uravnali pH na željeno vrednost.

#### Gojišče SAB

Gojišče SAB v prahu (Sigma-Aldrich, Nemčija) je primerno za selektivno kultivacijo kvasovk in ima pri 25 °C pH 5,6. Liter gojišča vsebuje 10 g mikološkega peptona ter 20 g dekstroze. Za pripravo trdnih gojitvenih petrijevk smo 22,5 g gojišča SAB skupaj s 15 g agarja (Biolife, Italija) raztopili v 750 ml destilirane vode. Nato smo vse skupaj avtoklavirali na 121 °C pri 1,3 bara za 15 minut ter po ohladitvi gojišče razlili v petrijevke.

#### Gojišče YNB

Gojišče YNB (Sigma-Aldrich, Nemčija) se uporablja za testiranje občutljivosti gliv in je v skladu s protokolom primerno za testiranje invazivnosti kvasovk. Gojišče smo pripravili tako, da smo v 50 ml stekleničko natehtali 0,76 g YNB, 2 g glukoze (Biolife, Italija) ter vse skupaj dopolnili z destilirano vodo do oznake. Gojišče YNB vsebuje dušik in snovi, ki jih z avtoklaviranjem uničimo, zato smo raztopino po pripravi sterilno prefiltirali. Za pripravo trdnih gojišč smo ločeno v 50 ml stekleničko natehtali 2 g agarja (Biolife, Italija), stekleničko z destilirano vodo dopolnili do oznake ter vse skupaj avtoklavirali. Po rahli ohladitvi smo sterilno prefiltirali gojišče YNB v topli avtoklaviran agar. Temu je sledilo aseptično razlivanje gojišča v majhne petrijevke. Gojišče smo nato porabili v naslednjih 2 dneh, saj se po prekoračenem času spremeni sestava gojišča.

#### Gojišče YNB z dodatkom protiglivične učinkovine

Po sterilni filtraciji YNB gojišča v topli avtoklaviran agar smo s pipeto prenesli 5,5 ml gojišča v sterilno epruveto, kamor smo z drugo pipeto dodali in suspendirali želeno koncentracijo protiglivične učinkovine. Nato smo 4,3 ml gojišča s protiglivično učinkovino s pomočjo pipete prenesli na v naprej označena gojišča.

### Medij RPMI 1640

Medij RPMI (Sigma-Aldrich, Nemčija) je široko uporabljen bazalni medij, ki omogoča kultivacijo sesalskih in drugih celic z zmanjšanim dodatkom FBS-a (Fetal Bovine Serum). Po protokolu se uporablja za test protiglivične občutljivosti standarda CLSI (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Medij smo pripravili tako, da smo v 500 ml steklenico natehtali 5,20 g medija RPMI, 17,27 g MOPS-a (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 0,15 g L-glutamina (Sigma-Aldrich, Nemčija) ter vse skupaj dopolnili z destilirano vodo do oznake. Raztopini smo nato umerili pH na 7 s 5M NaOH (Merc, Nemčija) ter jo sterilizirali s filtracijo s pomočjo vakuumskih črpalk. Medij RMPI smo pripravili en dan pred poskusom, saj po daljšem pretečenem času lahko oksidira.

### Medij RPMI 1640 z dodatkom protiglivične učinkovine.

V sterilni medij RMPI 1640 smo dodali preračunano količino protiglivične učinkovine amfotericin B, flukonazol, itrakonazol in kaspofungin, ki smo jih pred tem raztopili v vodi oz. DMSO (Sigma-Aldrich, Nemčija). Pri amfotericinu B in itrakonazolu, ki sta topna v DMSO smo tudi pazili, da končna koncentracija DMSO v mediju RPMI ni presegala 1 %, saj so večje koncentracije lahko toksične za kvasovke.

### Gojišče CMGM

Gojišče je sestavljeno iz 22 različnih sestavin (prikazane v preglednici 5) raztopljenih v 11 destilirane vode in se uporablja za simulacijo človeškega prebavnega sistema. Zaradi različne topnosti, smo topne in slabo topne sestavine raztopili ločeno, ter jih po umeritvi pH vrednosti raztopljenih topnih komponent zmešali med sabo. Gojišče smo uporabili za ponazoritev obnašanja komercialnih sevov v različnih delih prebavil, tako da smo gojišču umerili pH na 4,5; 6,5 in 7,5 s pomočjo 32 % HCL (Merc, Nemčija) ali 1M NaOH (Merc, Nemčija).

Preglednica 5: Sestava CMGM gojišča.

Complex Colonic Model Growth Medium (1l)					
Sestavina	g/l	Topnost v vodi	Sestavina	g/l	Topnost v vodi
Škrub	5	Slabo topen	Kvasni ekstrakt	4,5	Topen
Pektin	2	Slabo topen	FsSO <sub>4</sub> s 7H <sub>2</sub> O	0,005	Topen
Guar gum	1	Topen	NaCl	4,5	Topen
Mucin	4	Topen	KCl	4,5	Topen
Ksilan	2	Slabo topen	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5	Topen
Arabinogalaktan	2	Topen	MgSO <sub>4</sub> s 7H <sub>2</sub> O	1,25	Topen
Inulin	1	Slabo topen	CaCl <sub>2</sub> s 6H <sub>2</sub> O	0,15	Topen
Kazein	3	Slabo topen	NaHCO <sub>3</sub>	1,5	Topen
Peptonska voda	5	Topna	Cistein	0,8	Slabo topen
Tripton	5	Topen	Hemin	0,05	Slabo topen
Žolčne soli no. 3	0,4	Topne	Tween 80	1	Topen

### 3.2.3 Oprema

#### Laboratorijski pripomočki

- brizge
- centrifugirke (1 ml, 1,5 ml, 2ml)
- eze
- merilne bučk (25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml)
- merilni valji (50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)
- mikrotitrske plošče
- nastavki za pipete (tipsi) različnih velikosti
- petrijevke različnih velikosti
- pH indikatorski lističi
- pripomočki za mešanje
- pripomočki za sterilizacijo
- pripomočki za tehtanje
- steklene čaše (25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml)
- steklenice (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml)
- sterilni filtri (0,2 µm velikost por)
- stojala za epruvete in za centrifugirke
- urna in krovna steklca
- vrečke

#### Naprave

- avtoklav
- avtomatske pipete
- centrifugator
- hladilnik (4 °C)
- inkubator (28 °C, 37 °C in 39 °C)
- laminarij
- mikroskop LEICA
- optični čitalec TECAN
- pH meter
- tehtnica (gramska in mikogramska)
- termometri
- transiluminator
- vakumska črpalka
- zamrzovalna skrinja (-20 °C)
- zamrzovalnik (-80 °C)

### 3.3 METODE

Komercialne probiotične pripravke *S. boulardii* ter referenčne seve smo gojili na različnih gojiščih pri različnih pogojih rasti z dodatkom različnih koncentracij protigliivičnih učinkovin. Rast pri različnih pH vrednostih smo določali s pomočjo rasti na sintetičnem gojišču CMGM ter ob dodatku pepsina. Invazivnost posameznih sevov smo določali s kvantitativno metodo določanja invazivne rasti v agar pri različnih temperaturah ter ob dodatku različnih koncentracij protigliivičnih učinkovin. Za določanje protigliivične občutljivosti smo uporabili test občutljivosti protigliivičnih učinkovin standarda CLSI, s pomočjo istega testa smo testirali tudi modulatorne učinke izbranih medicinskih učinkovin na občutljivost sevov na protigliivične učinkovine.

#### 3.3.1 Izolacija sevov *S. boulardii*

Seve uporabljeni v magistrski nalogi smo izolirali iz komercialno razpoložljivih probiotikov nekatere pa pridobili iz zbirke ZIM.

#### **Postopek izolacije probiotične kvasovke *S. boulardii* iz komercialnih pripravkov:**

Probiotično kvasovko *S. boulardii* smo aseptično izolirali iz komercialno razpoložljivih probiotikov tako, da smo kapsulo probiotičnega pripravka raztopili v 5 ml sterilne destilirane vode s pomočjo vorteksiranja. Temu je sledila priprava redčitev s pomočjo destilirane vode. Po redčenju smo po 50 µl suspenzije prenesli na v naprej pripravljena in označena gojišča SAB, ter jo razmazali po gojišču. Vsako redčitev smo pri tem nanesli na 3 paralelke. Po končanem nanosu smo vseh 9 plošč inkubirali pri 28 °C, 2 dni. Po 2-dnevni inkubaciji smo na petrijevki z redčitvijo 10<sup>4</sup> izbrali čisto kolonijo, ki smo jo z ezo prenesli na novo gojitveno petrijevko ter tako izolirali čisto kulturo, katero smo uporabili za nadaljnje poskuse. Čiste vzorce izoliranih kolonij smo pri tem shranili tudi na -80 °C.

#### **Preverjanje živosti in štetje celic *S. boulardii* s pomočjo metilenskega modrila in računalniškega programa "ImageJ":**

Živost in število celic *S. boulardii* smo določili s pomočjo metilenskega modrila, mikroskopa s kamero (Leica) ter računalniškega programa "ImageJ". Pri tem smo 50 µl suspenzije v destilirani vodi raztopljljene kapsule prenesli v novo centrifugirko, v katero smo dodali 50 µl metilenskega modrila. Metilensko modrilo pri postopku prodre čez celično membrano mrtvih celic in celice obarva modro. Suspenzijo celic in metilenskega modrila smo nato zmešali na vorteksu, ter 20 µl suspenzije prenesli na Bürker-Türk ploščo prekrito s krovnim stekлом. Vzorec smo si nato ogledali z mikroskopom in glede na specifične nastavitve zajemanja slike posneli sliko vseh celic (aperatura 10, gama 1, črnobela slika) ter sliko živih celic (aperatura 1, gama 10, črnobela slika) v vidnem območju. Slike smo nato prenesli v računalniški program "ImageJ", s pomočjo katerega smo prešteli število celic na slikah. Iz dobljenega števila celic in ob upoštevanju razredčitve smo nato določili število živih in mrtvih celic v komercialnih probiotičnih pripravkih (Zupan in sod., 2013a).

#### **Preverjanje živosti in štetje celic *S. boulardii* z metodo določanja števila kolonijskih enot na trdnem gojišču CFU (colony forming unit):**

Živost in število celic smo prešteli tudi s pomočjo štetja kolonij na gojitvenih ploščah. Število kolonij smo določili s pomočjo števnega flomasterja in s pomočjo transiluminatorja, s katerim smo prenesli slike gojitvene plošče. Slike plošč smo nato obdelali z računalniškim

programom »Quantity one«, s katerim smo prešteli število kolonij na slikah (Gronewold in Wolpert, 2008).

### **3.3.2 Določanje rasti *S. boulardii* pri različnem pH**

Za določitev preživelosti *S. boulardii* skozi prebavni trakt smo merili rast pri 4 različnih vrednosti pH:

- pH 2 ob dodatku pepsina (želodčni pH)
- pH 5 (duodenum)
- pH 6,5 (jejunum)
- pH 8 (ileum)

#### **Rast v gojišču PBS (pH2) ob dodatku pepsina:**

Za določanje rasti v želodcu smo uporabili gojišče PBS, ki smo mu predhodno umerili pH na 2 z 32 % HCl, ter mu pred poskusom dodali pepsin. Testne seve smo pred poskusom centrifugirali 5 minut na 4.000 obratih, odlili supernatant ter pelet resuspendirali v sterilnem NaCl. Temu je sledilo štetje celic z računalniškim programom "ImageJ" ter inokulacija gojišča v centrifugirko s celicami koncentracije  $2,0 \times 10^7$  celic/ml. Po inokulaciji smo centrifugirke postavili v inkubator na 37 °C v anaerobno okolje. Vzorce smo vzorčili ob času 0, nato pa po 30, 60, 120 in 180 minutah. Vzorčili smo tako, da smo 50 µl vzorca v določenem časovnem intervalu zmešali s 50 µl metilenskega modrila ter s pomočjo Bürker-Türk števne plošče, mikroskopa (Leica) in računalniškega programa "ImageJ" prešteli število celic (Macfarlane in sod., 1998).

#### **Rast na sintetičnem gojišču Complex Colonic Model Growth Medium (pH 5; 6,5 in 8)**

Za določanje rasti pri prehodu iz dvanajsternika v črevo smo uporabili model gojišča CMGM, ki simulira pogoje v črevesju. Pri tem smo pripravili 3 paralelke tega gojišča in jim umerili pH na 5 in 6,5 z 32 % HCl ter pH 8 z NaOH. Pred poskusom smo testne seve centrifugirali 5 minut na 4.000 obratih, jim odlili supernatant ter pelet resuspendirali v sterilnem NaCl. Temu pa je sledilo štetje z računalniškim programom "ImageJ" ter inokulacija gojišča v centrifugirkah s celicami koncentracije  $2,0 \times 10^7$  celic/ml. Po inokulaciji smo celice postavili v inkubator na 37 °C v anaerobno okolje. Vzorce smo vzorčili po 1 uri od inokulacije, po 3 urah in po 24 urah od inokulacije. Vzorčili smo tako, da smo ob časovnem intervalu naredili redčitve  $10^1$ ,  $10^2$  in  $10^3$  s pomočjo sterilne destilirane vode, nato pa smo na gojišče SAB nanesli 3 kapljice volumna 20 µl ter gojišče dali inkubirati za 1 dan na 37 °C. Po inkubaciji smo nato s pomočjo lupe prešteli število kolonij, ki so zrastle v posamezni kapljici, ter ob upoštevanju redčitve določili število preživelih celic pri določeni vrednosti pH od določenem časovnem intervalu (Macfarlane in sod., 1998).

### **3.3.3 Določanje invazivne rasti probiotika *S. boulardii***

Invazivno rast probiotičnih kvasovk smo določali s kvantitativnim testom invazije v agar. Metoda se uporablja za določevanje volumna kolonij in invazivnosti sevov s pomočjo stopnje intenzitete slik testiranih kultur na gojiščih. Pri testu smo s pomočjo transiluminatorja Gel Doc 2000 (Bio-Rad, Italija) in računalniškega programa Quantity One izmerili in obdelali podatke o celokupnih volumnih ter invazivnih delih kolonij ter tako izračunali invazivnost ozioroma relativno invazivnost, s pomočjo katere smo določili stopnjo invazivne rasti kvasovk v gojišče (Zupan in Raspot, 2008).

### **Kvantitativna metoda določanja invazivne rasti v agar pri 37 °C in 39 °C:**

Na gojišču YNB za testiranje invazivnosti testiranih sevov, smo s pomočjo enakostraničnega trikotnika označili točke nanosa sevov. Na označene točke smo nato nanesli po eno kolonijo z metodo cepljenja 1 kolonije na gojišče. Pri tej metodi smo z ezo pobrali del kulture iz SAB gojišča ter oblikovali koničasto obliko kulture. Nato smo se s koničasto kulturo le na rahlo dotaknili označenih točk na YNB gojišču za testiranje invazivnosti. Nato smo del gojišč inkubirali pri 37 °C, del pa pri 39 °C 4 dni. Po končani inkubaciji smo s pomočjo transiluminatorja Gel Doc 2000 slikali vse male petrijevke skupaj z referenco, ki jo je predstavljal košček papirja s črnim kvadratom. Košček papirja je pri poskusu služil kot standard za normalizacijo optičnih pogojev. Po končanem slikanju smo zgornji del kultur na petrijevki sprali z destilirano vodo ter tako preverili, kateri sevi so rastli invazivno. Po spiranju kultur na zgornji strani petrijevk smo ponovili slikanje spranih petrijevk s pomočjo transiluminatorja Gel Doc 2000. Volumen kolonij smo nato določili denzitometrično z računalniškim programom Quantity one (BioRad). Programska oprema Quantity one definira volumen, kot produkt površine in intenzitete analizirane lise (Zupan in Raspot, 2010).

### **Določanja vrednosti MICING (minimalna inhibitorna koncentracija invazivne rasti pri 37 °C):**

Določanje invazivne rasti v agar ob dodatku različnih koncentracij protigliivičnih učinkovin, je potekalo, kot je opisano v članku (Zupan in sod., 2015). Test poteka po enakem postopku kot kvantitativna metoda določanja invazivne rasti v agari pri 37 °C in 39 °C, le da je inkubacija potekala le pri 37 °C ter, da smo kulture nanašali na YNB gojišča z dodatkom različnih koncentracij protigliivičnih učinkovin (0,125-32 µg/ml). Pri tem je vrednost MICING (minimalna inhibitorna koncentracija protigliivične učinkovine za invazivno rast) definirana, kot koncentracija protigliivične učinkovine, nad katero je invazivna rast kvasovk bistveno zatrta (Zupan in sod., 2015).

#### **3.3.4 Določanje protigliivične odpornosti probiotika *S. boulardii* s pomočjo testa občutljivosti protigliivičnih učinkovin standarda CLSI**

Protigliivično odpornosti probiotika *S. boulardii* smo določali s testom občutljivosti standarda Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M27-A3), ki se uporablja za testiranje občutljivosti kvasovk v mikrotitrskih ploščah.

CLSI metodo določanja protigliivične občutljivosti smo izvajali na vseh testiranih sevih na mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami. Kot protigliivične učinkovine smo uporabili 2 azolni učinkovini flukonazol in itrakonazol ter kaspofungin in amfotericin B kot neazolni protigliivični učinkovini. Pri tem smo pazili na topnost saj sta flukonazol in kaspofungin topna v vodi, itrakonazol ter Amphotericin B pa v DMSO. V primeru, da smo protigliivično učinkovino raztopili v DMSO smo pazili, da je bila njena končna koncentracija v vzorcu 1 %. Pri testiranju smo za vsak testiran sev posebej določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) v µg/ml. Glede na protokol CLSI smo pri azolnih protigliivičnih učinkovinah in kaspofunginu MIC odčitali pri 50 % inhibiciji rast, medtem ko smo pri amfotericinu B MIC odčitali tam, kjer je bila rast sevov popolnoma zavrtta. CLSI metodo smo izvajali na gojiščih RPMI ter SAB (CLSI, 2008; CLSI, 2010).

Sama metoda CLSI je določena tako, da predpriprava obsega pripravo gojišča ter 1 dnevno inkubacijo sevov na SAB gojišču pri 35 °C. Na dan poskusa smo protiglivične učinkovine razredčili v gojišču do koncentracije 32 µg/ml za amfotericin B in itrakonazol, flukonazol do koncentracije 128 µg/ml ter kaspofungin do koncentracije 16 µg/ml. S pomočjo štetja celic z računalniškim programom "ImageJ" smo število predhodno inkubiranih celic na gojišču umerili na  $5 \times 10^3$  celic/ml, ter tako dosegli enako število celic v vseh suspenzijah. Določevanju števila celic v suspenziji ter pripravi raztopin je nato sledil nanos le teh na mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami po naslednjem protokolu (CLSI, 2008; CLSI, 2010).

**Protokol nanosa gojišča, suspenzije celic in protiglivične učinkovine na mikrotitrske plošče:**

- 100 µl gojišča smo nanesli v vse jamice na mikrotitrski plošči razen v prvi stolpec.
- V 12. stolpec, ki nam je služil kot negativna kontrola smo nanesli dodatnih 100 µl gojišča.
- V prvi stolpec smo nanesli 200 µl v naprej pripravljene raztopine protiglivične učinkovine.
- Temu je sledilo 10x mikrodilutiranje protiglivične učinkovine do 10. stolpca. Pri tem smo 100 µl protiglivične učinkovine iz prvega stolpca prenesli v drugi stolpec, raztopino zmešali s pipeto ter postopek ponovili do 10. stolpca. Ko smo prišli do 10. stolpca smo preostanek 100 µl zavrgli (končna koncentracija protiglivičnih učinkovin prikazana v preglednicah 6-8).
- Po nanosu gojišča in razredčitvi protiglivične učinkovine, samo v vse stolpce razen v 12. inokulirali po 100 µl celic. 11. stolpec nam je tako služil kot pozitivna kontrola.
- Po končanem nanosu smo dobili različne koncentracije protiglivičnih učinkovin ob prisotnosti  $5 \times 10^3$  celic/ml, kot to prikazujejo spodnje preglednice (CLSI, 2008; CLSI, 2010).

Preglednica 6: Končna koncentracija protiglivičnih učinkovin amfotericin B in itrakonazol

Topen v DMSO (amfotericin B, itrakonazol)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB
B	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB
C	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB
D	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB
E	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB
F	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB
G	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB
H	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0	RPMI/SAB

Preglednica 7: Končna koncentracija protiglivične učinkovine flukonazol

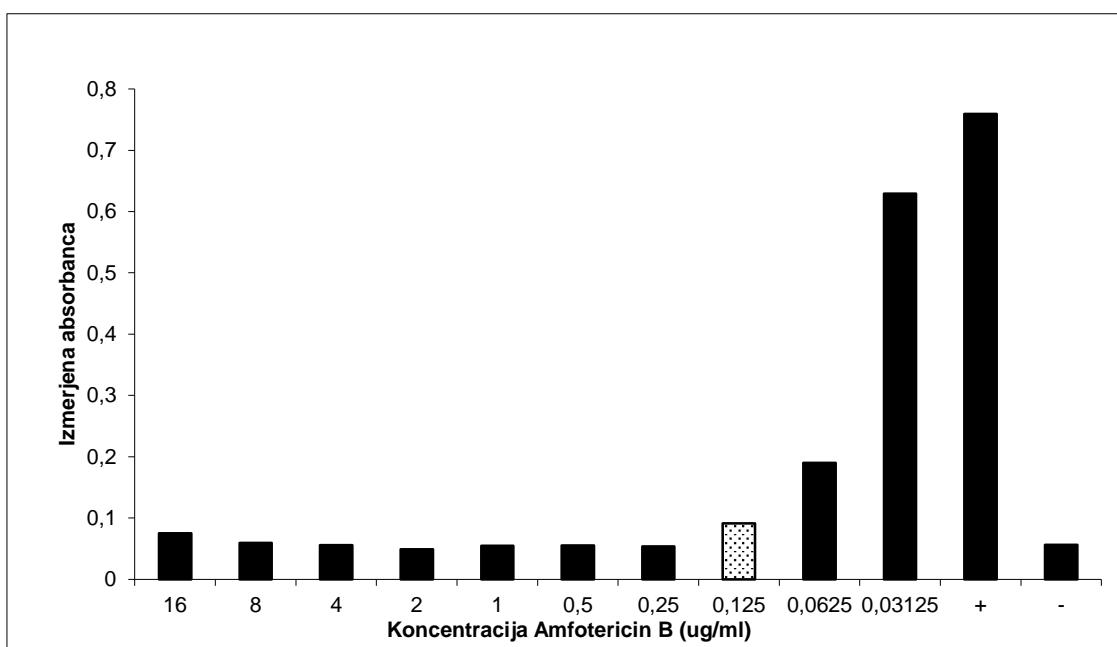
Topen v vodi (flukonazol)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB
B	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB
C	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB
D	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB
E	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB
F	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB
G	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB
H	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0	RPMI/SAB

Preglednica 8: Končna koncentracija protiglivične učinkovine kaspofungin

Topen v vodi (kaspofungin)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB
B	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB
C	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB
D	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB
E	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB
F	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB
G	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB
H	8	4	2	1	0,5	0,25	0,13	0,06	0,03	0,02	0	RPMI/SAB

Po končanem nanosu protiglivičnih učinkovin (prikazano v preglednicah 6,7 in 8) ter testiranih sevov smo mikrotitrtske plošče s 96 jamicami dali v inkubator na 35 °C. Rezultate smo odčitali po 24 urah za protiglivične učinkovine amfotericin B in kaspofungin ter po 48 urah za azolni protiglivični učinkovini (CLSI, 2008; CLSI, 2010).

Rezultate smo po inkubaciji odčitali s pomočjo optičnega čitalca TECAN ter računalniškega programa »Magellan«. Pri tem smo s pomočjo optične gostote ( $OD_{650}$ ) določili MIC za vsak testiran sev ob prisotnosti različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin. Vrednost MIC testiranih sevov, smo določili pri koncentraciji, kjer je bila rast sevov ničelna (amfotericin B) oz. smo z optičnim čitalcem zaznali samo absorbanco čistega medija, medtem ko smo vrednost MIC pri flukonazolu, itrakonazolu in kaspofunginu določili tam, kjer je bila rast sevov za 50 % manjša v primerjavi z rastjo v istih pogojih brez dodatka protiglivične učinkovine. Pri določevanju vrednosti MIC testiranih sevov smo si pomagali z grafom, na katerem smo predstavili podatke o absorbancah pridobljene z optičnim čitalcem (slika 15).



Slika 15: Vrednost absorbance (OD 650) testirane probiotične kvasovke PRO 2 (mikrotitrskra plošča z 96 jamicami) na grafu s pomočjo katerega smo določili vrednost MIC, v tem primeru protigliivične učinkovine amfotericin B (MIC pri 0,125 µg/ml).

### 3.3.5 Testiranje modulatornih učinkov (sinergizem/antagonizem) medicinskih učinkov na občutljivost sevov *S. boulardii* na protigliivične učinkovine

Testiranje modulatornih učinkov medicinskih učinkov na občutljivost sevov na protigliivične učinkovine smo tako kot pri točki 3.3.4 izvedli s CLSI testom od dodatku različnih koncentracij medicinskih učinkov, ki se uporabljajo pri zdravljenju bolnikov z oslabljenim imunskim sistemom. Pri poskusu smo kot medicinsko učinkovino uporabili antibiotik vankomicin ter imunosupresiva FK506 ter MPA v kombinaciji s protigliivičnimi učinkovinami amfotericin B, flukonazol in itrakonazol. Testirano območje koncentracij medicinskih učinkov smo določili glede na povprečno koncentracijo medicinskih učinkovin v krvi pacientov. Povprečna koncentracija vankomicina je med 10-100 µg/ml, MPA med 1-20 µg/ml ter FK506 med 1-1000 µg/ml. Modulatorne učinke medicinskih učinkovin na občutljivost sevov na protigliivične učinkovine smo pri tem testirali na sevih PRO1 in PRO5 probiotične kvasovke *S. boulardii*.

Predprizprava testiranja modulatornih učinkovin je vsebovala iste korake priprave protigliivičnih učinkovin, gojišč in suspenzije celic kot v točki 3.3.4. Poleg tega smo posebej pripravili še 2x in 4x najvišje testirane koncentracije raztopin medicinskih učinkovin. Tako smo dobili raztopine z naslednjimi koncentracijami medicinskih učinkovin:

Vankomicin:

- Testirano območje (µg/ml) = **0, 5, 10, 20, 40, 80, 160**
- 4x max koncentracija (µg/ml) = **640**
- 2x max koncentracija (µg/ml) = **320**

MPA:

- Testirano območje ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = **0, 2, 4, 8, 16, 32, 64**
- 4x max koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = **256**
- 2x max koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = **128**

FK506:

- Testirano območje ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = **0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4**
- 4x max koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = **16**
- 2x max koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = **8**

Koncentracijo uporabljene protiglivične učinkovine v testu modulatornih učinkov smo določili glede na MIC, ki smo predhodno določili za seva PRO1 in PRO5 probiotične kvasovke v testu pod točko 3.3.4. Pri testu modulatornih učinkov smo tako uporabili 4x koncentracijo MIC določene protiglivične učinkovine pri testiranam sevu. Po koncu mikrodilutiranja protiglivičnih učinkovin smo tako imeli v stolpcih koncentracijo protiglivičnih učinkovin, ki so sovpadale z 2xMIC, MIC, MIC/2 ter MIC/4, kot to prikazujejo preglednice 9, 10 in 11. Na podlagi rasti sevov pri višji koncentraciji MIC vrednosti ob prisotnosti medicinske učinkovine smo tako lahko sklepali, da medicinska učinkovina antagonistično vpliva na občutljivost probiotičnega seva na protiglivično učinkovino. V primeru odsotnosti rasti sevov pod koncentracijo MIC pa smo lahko sklepali, da medicinska učinkovina sinergistično vpliva na občutljivost probiotičnega seva na protiglivično učinkovino (CLSI, 2008; CLSI, 2010).

Raztopine protiglivičnih učinkovin smo pripravili z naslednjimi koncentracijami:

Flukonazol:

MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = 32

4x max koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = 128

Itrakonazol:

MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = 1

4x max koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = 4

Amfotericin B:

MIC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = 0,250

4x max koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = 1

Predpripravi raztopin, gojišča in suspenzije celic je sledil nanos na mikrotitrsko ploščo s 96 jamicami po naslednjem protokolu.

### **Protokol nanosa gojišča, suspenzije celic, protiglivične učinkovine in medicinske učinkovine na mikrotitrski plošče (preglednice 9, 10, 11):**

- 100 µl gojišča smo prenesli v vse jamice razen v G vrstico in v jamice H5-H8.
- V jamice H9-H12 smo dodali dodatnih 100 µl medija, kar nam je služilo kot negativna kontrola (-K)
- 200 µl 4x najvišje koncentracije medicinske učinkovine smo nanesli v jamice G1, G5 in G9
- 200 µl 2x najvišje koncentracije medicinske učinkovine smo nanesli v jamice G2-G4, G6-G8 ter G10-G12.
- Temu je sledilo 10x mikrodilutiranje medicinske učinkovine navzgor od G do B vrstice. Pri tem smo 100 µl medicinske učinkovine iz G vrstice prenesli v F vrstico, raztopino zmešali s pipeto ter postopek ponovili do B vrstice. Ko smo prišli do B vrstice smo preostanek 100 µl zavrgli.
- Nato smo 100 µl 4x MIC koncentracije protiglivične učinkovine nanesli v stolpec od A1-G1, A5-G5 in A9-G9.
- Temu je sledilo 10x mikrodilutiranje protiglivične učinkovine od 1. do 4. stolpca, 5. do 8. stolpca in od 9. do 12. stolpca brez vrstice H. Ko smo prišli do 4., 8. in 9. vrstice smo preostanek 100 µl zavrgli.
- Na koncu smo inokulirali 100 µl suspenzije celic v vse jamice razen v jamice H5-H12. Jamice H1-H4 so nam pri testu služile kot pozitivna kontrola (+K).

Preglednica 9: Končna koncentracija medicinske učinkovine MPA ( $\mu\text{g/ml}$ )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
D	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
E	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
F	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
G	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
H	+K	+K	+K	+K					-K	-K	-K	-K
	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4
	paralelka 1				paralelka 2				paralelka 3			

Legenda: +K (pozitivna kontrola), -K (negativna kontrola), 2xMIC (dvakratna vrednost MIC protiglivične učinkovine), MIC (minimalna inhibitorna koncentracija protiglivične učinkovine), MIC/2 (polovična vrednost MIC protiglivične učinkovine), MIC/4 (četrt vrednosti MIC protiglivične učinkovine).

Preglednica 10: Končna koncentracija medicinske učinkovine FK506 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
C	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
D	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
F	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
G	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
H	+K	+K	+K	+K					-K	-K	-K	-K
	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4
			paralelka 1				paralelka 2					paralelka 3

Legenda: +K (pozitivna kontrola), -K (negativna kontrola), 2xMIC (dvakratna vrednost MIC protiglivične učinkovine), MIC (minimalna inhibitorna koncentracija protiglivične učinkovine), MIC/2 (polovična vrednost MIC protiglivične učinkovine), MIC/4 (četrt vrednosti MIC protiglivične učinkovine).

Preglednica 11: Končna koncentracija medicinske učinkovine vankomicin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
C	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
D	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
E	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
F	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
G	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160
H	+K	+K	+K	+K					-K	-K	-K	-K
	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4	2xMIC	MIC	MIC/2	MIC/4
			paralelka 1				paralelka 2					paralelka 3

Legenda: +K (pozitivna kontrola), -K (negativna kontrola), 2xMIC (dvakratna vrednost MIC protiglivične učinkovine), MIC (minimalna inhibitorna koncentracija protiglivične učinkovine), MIC/2 (polovična vrednost MIC protiglivične učinkovine), MIC/4 (četrt vrednosti MIC protiglivične učinkovine).

Po končanem nanosu medicinskih učinkov, protiglivičnih učinkov ter testiranih sevov smo mikrotitrski plošče s 96 jamicami dali v inkubator na 35 °C. Rezultate smo odčitali po 24 urah za protiglivične učinkovine amfotericin B in kaspofungin ter po 48 urah za flukonazol in itrakonazol.

Rezultate modulatornih učinkov smo odčitali s pomočjo optičnega čitalca TECAN ter računalniškega programa »Magellan«. Pri tem smo s pomočjo optične gostote (OD<sub>650</sub>) določili rast sevov pri večjih, manjših ali nespremenjenih vrednostih MIC glede na dodatek medicinske učinkovine, ter tako določili sinergističen ali antagonističen učinek medicinskih učinkov na občutljivost sevov na protiglivične učinkovine (CLSI, 2008; CLSI, 2010).

## 4 REZULTATI

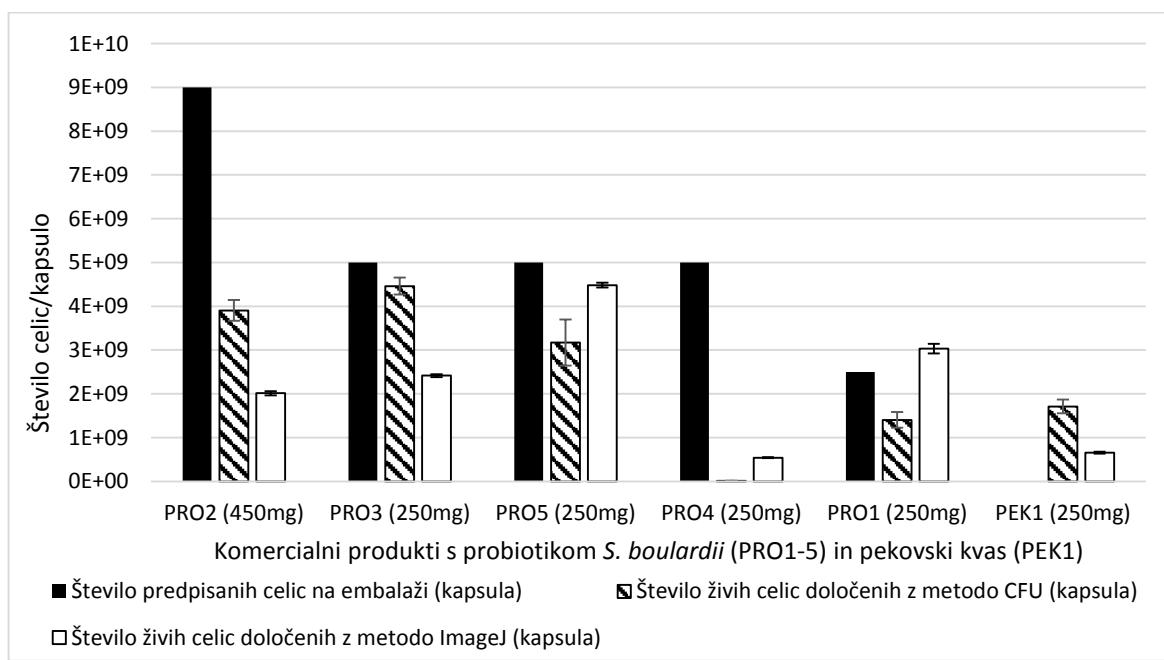
Rezultate smo pridobili v raziskavah, ki smo ji opravili med 6.3.2013 in 2.10.2013 na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil. V tem času smo izvedli 5 sklopov eksperimentov, kateri so opisani v poglavju 3.3. na 15 testiranih sevih (preglednica 3). S pomočjo pridobljenih rezultatov smo preverili i) ujemanje števila celic na embalaži komercialnih pripravkov s številom celic, ki smo jih prešteli z metodama "ImageJ" in CFU na kapsulo. Z rezultati rasti komercialnih probiotikov pri različnih pH vrednostih smo ii) določili njihovo preživelost pri pH 2, pH 5, pH 6,5 in pH 8. Na podlagi rezultatov kvantitativnega testa invazije v agar in testa občutljivosti protigliivičnih učinkovin standarda CLSI pa smo iii) določili invazivnost probiotičnih kvasovk *S. boulardii*, iv) odpornost na protigliivične učinkovine ter v) modulatorne učinke medicinskih učinkovin na občutljivost protigliivičnih učinkovin na rast *S. boulardii*.

### 4.1 IZOLACIJA PROBIOTIKA *S. boulardii*

#### 4.1.1 Število celic v kapsulah komercialnih probiotikov

S štetjem celic v kapsulah komercialnih pripravkov *S. boulardii* smo primerjali število predpisanih celic na embalažah komercialnih pripravkov s številom celic, ki smo jih določili z metodama "ImageJ" in CFU na kapsulo po postopku opisanemu v 3.3.1.

Na sliki 16, so predstavljeni rezultati števila predpisanih celic na embalaži v primerjavi s številom celic določenih z metodama CFU in "ImageJ" z izračunanim standardnim deviacijam.



Slika 16: Pregled vrednosti števila kvasovk v analiziranih vzorcih probiotičnih preparatov v primerjavi s klasičnim pekovskim kvasom.

### **Metoda CFU**

Največje število predpisanih celic na embalaži vzorcev znaša  $9,0 \times 10^9$  (PRO2), kar sovpada z večjo 450 mg kapsulo. Najmanjše število predpisanih celic na vzorcih pa znaša  $2,5 \times 10^9$  (PRO1). Odstopanje predpisanih celic od števila določenega z metodo CFU je bilo opazno pri vzorcih PRO2 ( $3,9 \times 10^9$  celic na kapsulo) in PRO4 ( $1,0 \times 10^7$  celic na kapsulo), kjer je bilo izmerjeno število celic opazno manjše, kot to navaja deklaracija. Vzorec PRO4 je imel najvišje odstopanje in najmanjšo število celic določenih z metodo CFU na kapsulo. Pri ostalih sevih (PRO3, PRO5, PRO1) je bilo število predpisanih celic primerljivo z izmerjenim številom celic določenih z metodo CFU na kapsulo. Relativna standardna deviacija metode CFU je bila visoka in se je gibala med 4,3 % (PRO3) in 20,4 % (PRO4) s srednjo vrednostjo 12 %.

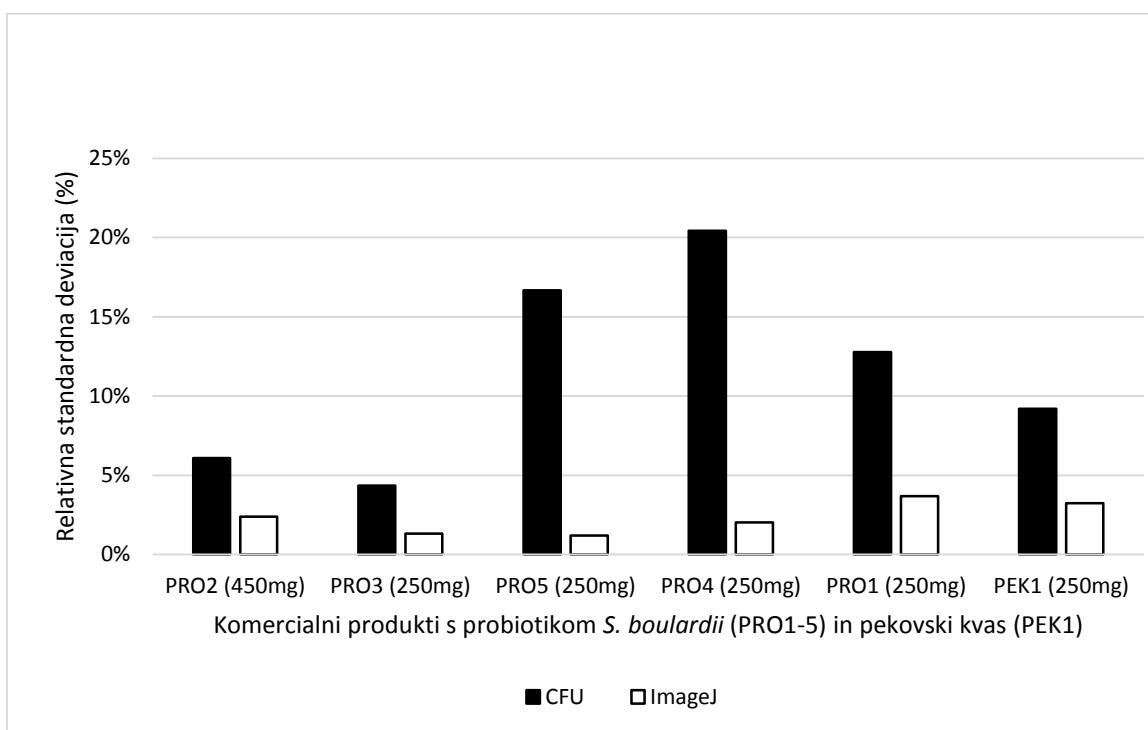
### **Metoda "ImageJ"**

Število celic v kapsulah komercialnih probiotikov je v večini ustrezalo številu predpisanih celic na embalaži. Izrazito odstopanje od števila navedenega na embalaže se je pojavilo le pri vzorcih PRO2 ( $2,0 \times 10^9$  celic) in (PRO4  $5,4 \times 10^8$  celic). Manjše odstopanje se je pojavilo tudi pri sevu PRO3 ( $2,4 \times 10^9$  celic). Vzorca PRO2 in PRO4 sta imela najvišje odstopanje in najmanjšo število celic določenih z metodo Image. Pri pekovskem kvasu PEK1 smo opazili, da je bilo število celic večje od števila celic v vzorcu komercialnega probiotika PRO4, ter podobno vsem ostalim vzorcem. V primerjavi z metodo CFU, je bila relativna standardna deviacija metode "ImageJ" manjša in se je gibala med 1,2 % (PRO5) in 3,7 % (PRO1) s srednjo vrednostjo 2,4 %.

Na podlagi rezultatov obeh metod, lahko sklepamo, da je povprečno število živih celic v kapsulah komercialnih probiotikov višje od  $1,0 \times 10^7$  celic na kapsulo.

#### **4.1.2 Primerjava metod "ImageJ" in CFU na kapsulo**

Primerjava relativnih standardnih deviacij med metodama "ImageJ" in CFU na kapsulo (slika 17), nam kaže, da je pri metodi CFU na kapsulo prihajalo pri merjenju do večjih odstopanj ter posledično do večjih napak ozioroma večjih standardnih deviacij. Izračunana relativna standardna deviacija pri vzorcu PRO4 je presegla celo 20 %, kar kaže na slabo ponovljivost metode. Z metodo "ImageJ" smo dobili bolj ponovljive rezultate, saj standardna deviacija ni odstopala za več kot 4 %.



Slika 17: Primerjava relativnih standardnih deviacij med metodama "ImageJ" in CFU na kapsulo, za določevanje števila živih celic v testiranih komercialnih probiotikih (PRO1-5) in pri komercialnem kvasu (PEK1).

## 4.2 RAST PROBIOTIKA *S. boulardii* PRI RAZLIČNEM pH

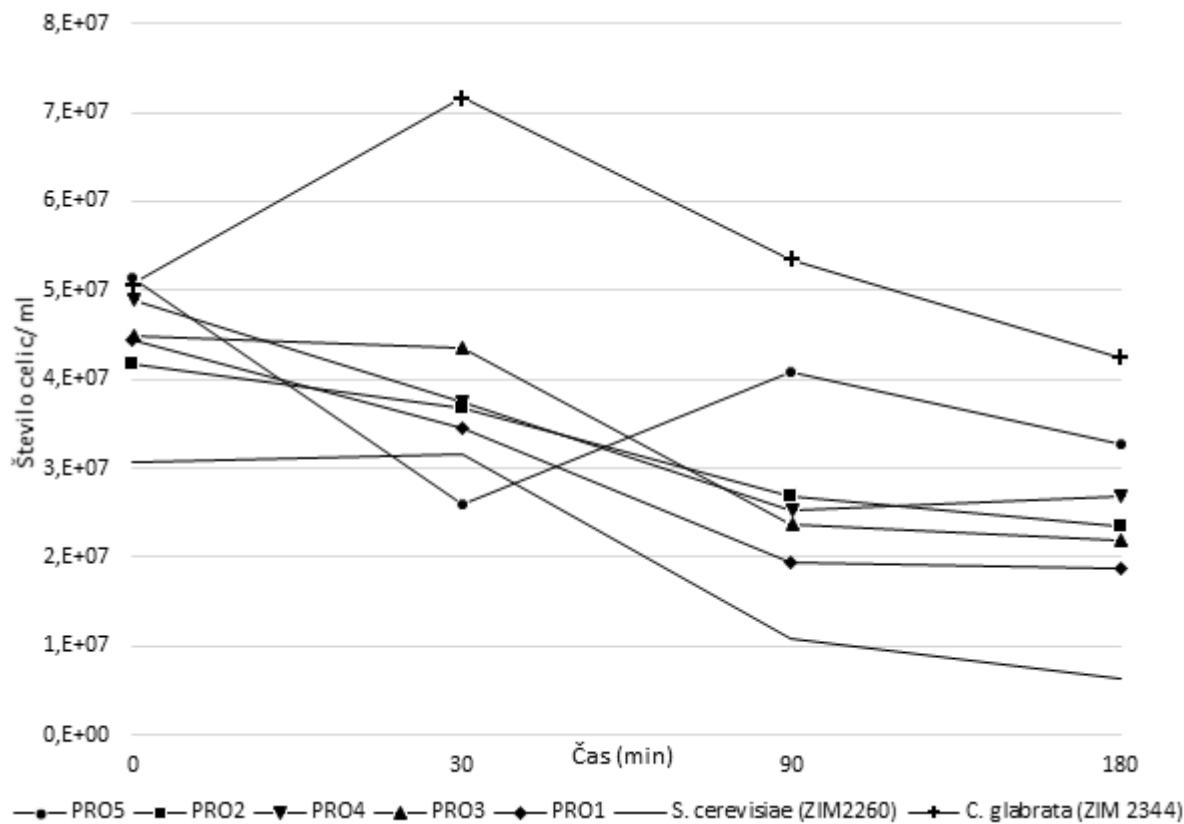
### 4.2.1 Rast probiotika *S. boulardii* pri pH 2 ob dodatku pepsina

Z določevanjem rasti testiranih sevov pri pH 2 ob dodatku pepsina smo z metodo "ImageJ" (glej poglavje 3.3.2) preverjali preživelost sevov pri pH vrednosti, ki je značilna za prehod skozi želodec. Začetno koncentracijo testiranih sevov smo umerili na  $4,0 \times 10^7$  celic/ml, ter nato v časovnih intervalih 0, 30, 60, 90 in 180 minut spremljali živost testiranih sevov z metodo "ImageJ". Za referenco smo uporabili patogena seva *C. glabrata* in *S. cerevisiae*.

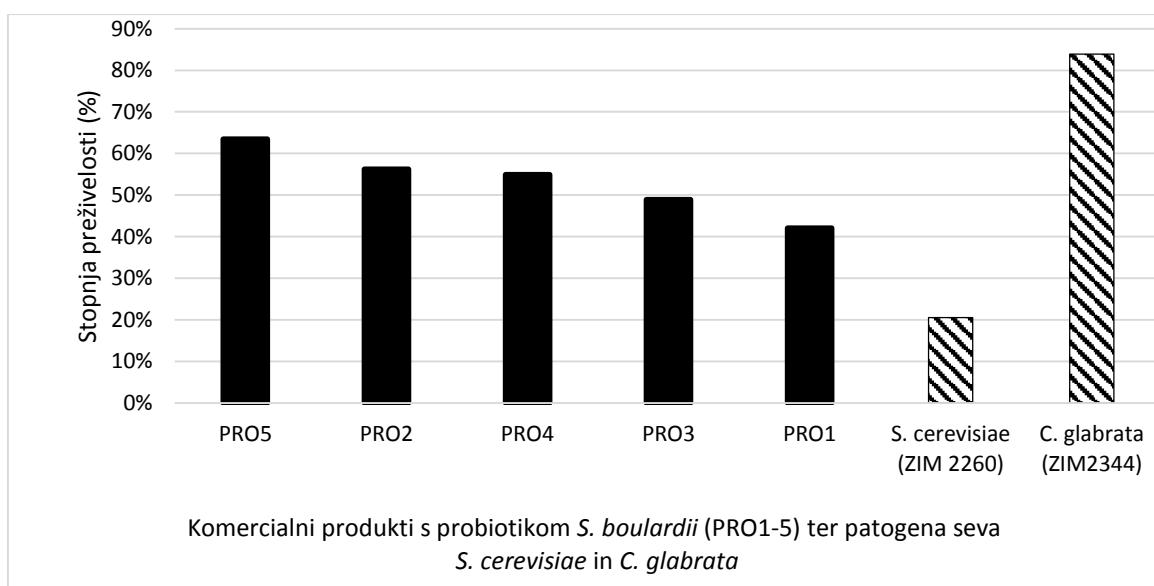
Rezultati preživelosti na posameznem časovnem intervalu (slika 18) kažejo na to, da celice na začetku poskusa prilagodijo celične mehanizme na spremenjene rastne pogoje (pH 2 + pepsin). To se na sliki 18 odraža v večjem padcu števila celic vse tja do 3 intervala (90min), ko se celice prilagodijo na nove razmere. Med 90 in 180 min lahko opazimo počasnejše upadanje števila celic, kar lahko pripisemo prilagoditvi celic na nizek pH. Stopnja preživelosti probiotika *S. boulardii* glede na sliko 19 kaže na to, da so imeli komercialni probiotični sevi *S. boulardii* nizko občutljivost na pH 2 ob dodatku pepsina. Najvišjo stopnjo preživelosti je imel PRO5 63 %, najnižjo pa PRO1 42 %. Povprečna stopnja preživelosti vseh testiranih probiotičnih sevov je bila 53 %.

Rezultati referenčnih patogenih sevov kvasovk *C. glabrata* in *S. cerevisiae* so se občutno razlikovali med seboj. Sev kvasovke *C. glabrata* je imel v primerjavi z vsemi testiranimi probiotičnimi sevi najvišjo stopnjo preživetja (84 %), kar lahko pripisemo visoki patogenosti samega seva. Opazimo lahko, da je *C. glabrata* kljub drastično spremenjenim življenskim

pogojem rastla od inokulacije naprej ter tako še povečala število začetnih celic. Klinični sev *S. cerevisiae* je rastel najslabše v primerjavi z ostalimi sevi (slika 19).



Slika 18: Živost probiotika *S. boulardii* (PRO1-5) v različnih časovnih intervalih pri kislem pH 2 ob dodatku pepsina na 37 °C, v primerjavi z živostjo patogenih sevov (*S. cerevisiae* in *C. glabrata*).



Slika 19: Stopnja preživelosti probiotika *S. boulardii* (PRO1-5) in patogenih sevov *S. cerevisiae* in *C. glabrata* po 3-urni inkubaciji na 37 °C v kislem pH 2 ob dodatku pepsina.

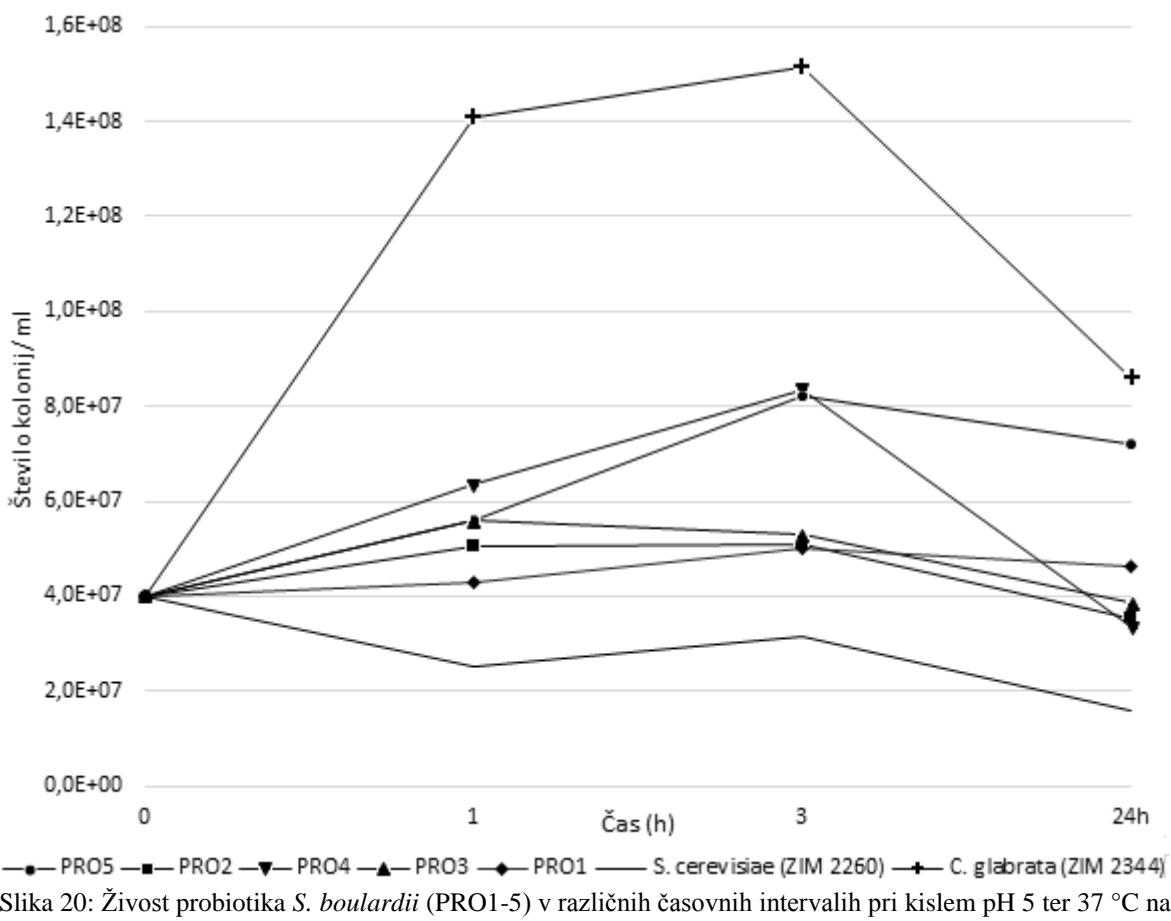
#### 4.2.2 Rast probiotika *S. boulardii* pri pH 5 in 6,5

Z testiranjem rasti komercialnih probiotikov *S. boulardii* pri pH 5 in 6,5 smo v različnih časovnih intervalih (0h, 1h, 3h, 24h) preverili preživelost testiranih sevov pri pH značilnem za prehod skozi dvanajstnik, kjer pH naraste iz kislega pH 5 do pH 7,5.

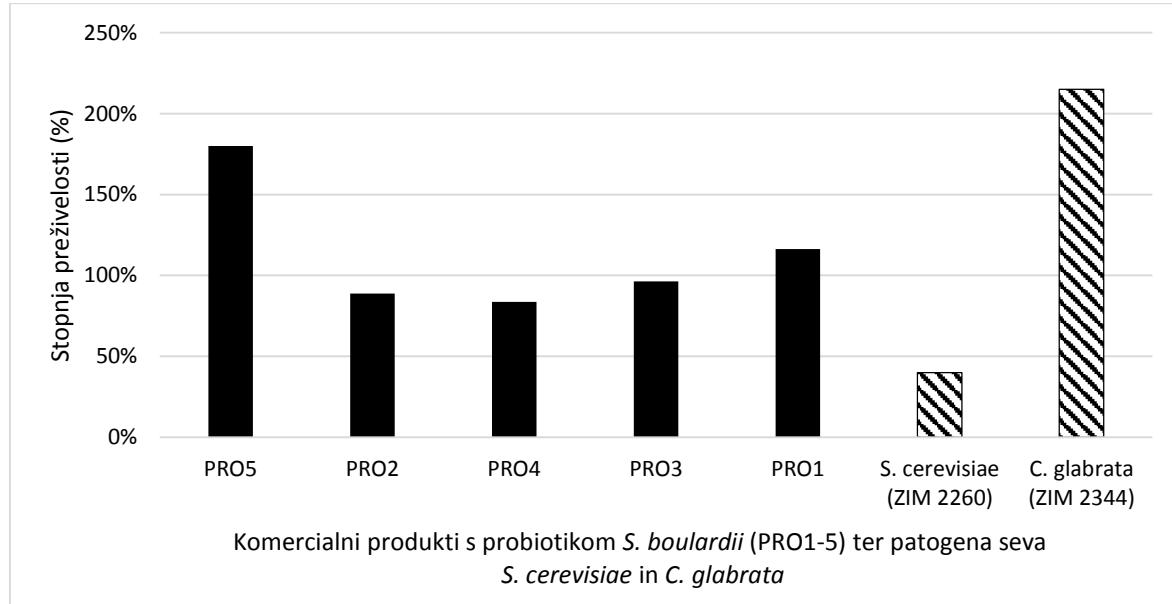
Število celic v testiranih vzorcih smo določili z metodo CFU po protokolu opisanem v 3.3.2. Za metodo CFU smo se odločili zaradi velike motnosti medija CMGM. Pred poskusom smo namreč poskusili prešteti število celic v mediju CMGM tudi z metodo "ImageJ", vendar je to štetje pokazalo veliko odstopanje zaradi prisotnih delcev v mediju CMGM, ki so po velikosti in obliki spominjali na celice.

Rezultati rasti testiranih komercialnih probiotičnih sevov *S. boulardii* pri pH 5 (slika 20) kažejo na to, da 3 urna izpostavitev pH 5 bistveno ne vpliva na preživetvene sposobnosti probiotikov. Število kolonij se v intervalu 24h bistveno ni spreminalo. Na podlagi stopnje preživelosti vseh probiotičnih sevov po 24-urni inkubaciji na 37 °C pri pH 5 (slika 21) lahko torej sklepamo, da komercialnim probiotičnim sevom *S. boulardii* ustreza rast v kislem pH 5. Glede na to, da je povprečni zadrževalni čas probiotikov v dvanajstniku 1-2h, bi lahko kot bolj točne rezultate upoštevali rezultate na intervalu 1h, na podlagi katerih lahko sklepamo, da enourna izpostavitev kislemu pH 5 ne prizadene testiranih probiotičnih sevov oz. da ugodno vpliva na njihovo rast.

V primerjavi rasti probiotikov z rezultati rasti patogenih referenc *C. glabrata* in *S. cerevisiae* lahko opazimo razlike v preživelosti (slika 21). *C. glabrata* je pri pH 5 rastla na gojišču CMGM in je celo podvojila koncentracijo, medtem ko je *S. cerevisiae* slabo uspevala in imela okoli 40 % stopnjo preživelosti, kar namiguje na slabšo odpornost testiranega seva v primerjavi s testiranimi probiotičnimi sevi. Rezultati kažejo na to, da pH 5 ugodno vpliva na rast *C. glabrata* ter testiranih probiotičnih sevov, ki so na poti do svojega tarčnega cilja izpostavljeni kisli vrednosti pH.



Slika 20: Živost probiotika *S. boulardii* (PRO1-5) v različnih časovnih intervalih pri kislem pH 5 ter 37 °C na gojišču CMGM, v primerjavi z živostjo patogenih sevov (*S. cerevisiae* in *C. glabrata*).

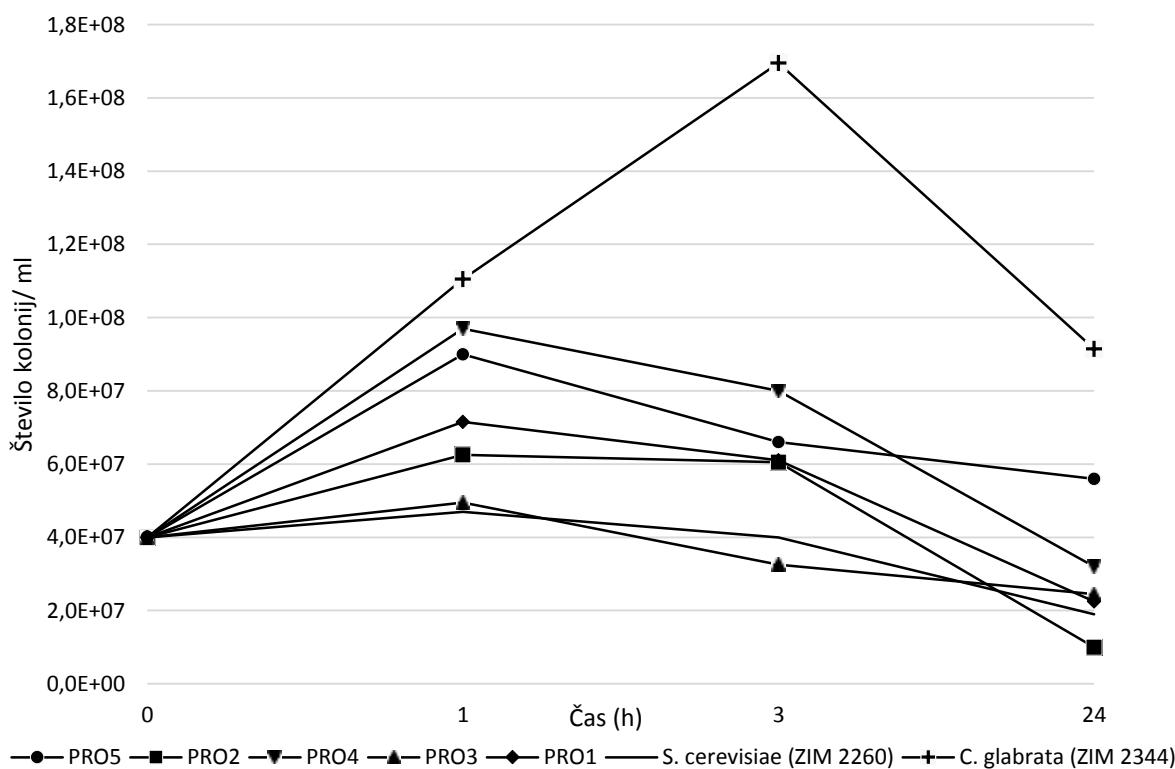


Slika 21: Stopnja preživelosti probiotika *S. boulardii* (PRO1-5) in patogenih sevov *S. cerevisiae* in *C. glabrata* po 24-urni inkubaciji na 37 °C v kislem pH 5 ter 37 °C na gojišču CMGM.

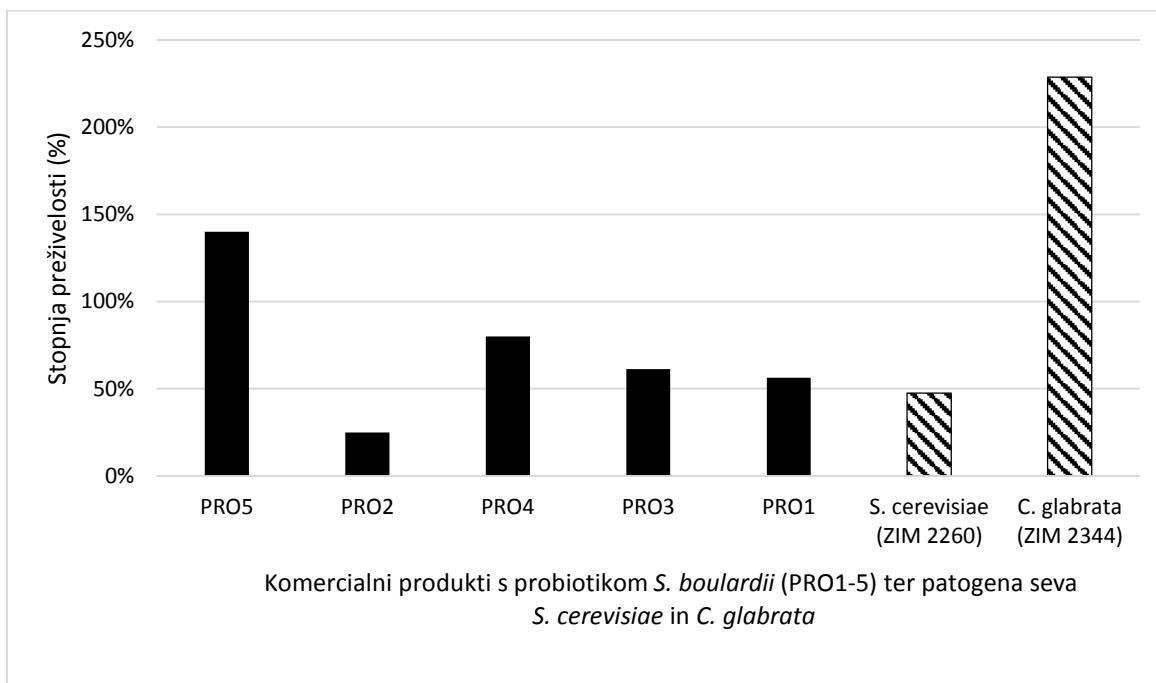
V primerjavi z rezultati rasti pri pH 5 testirani probiotični sevi slabše rastejo pri pH 6,5 (slika 22 in slika 23). Po 1h kultivacije pri pH 6,5 so vsi testirani probiotiki povečali svojo rast, nato pa smo po 3 h in še posebej po 24 h opazili padec v primerjavi s pH 5. Število živih celic glede na čas 0 komercialnih probiotikov se je po 24 urah gibalo med 140 % (PRO5) in 25 % (PRO2). Testirani sevi so tako glede na rezultate v povprečju kar za 25 % slabše rastli pri pH 6,5 kot pa pri pH 5.

Rezultati stopnje preživelosti pri kislih pH vrednostih (2, 5 in 6,5) kažejo na to, da je najbolj idealen pH 5 za rast probiotičnih sevov. Glede na odstopanje rezultatov rasti probiotičnega seva PRO5 od ostalih probiotičnih sevov lahko sklepamo, da se je sev PRO5 razlikoval od ostalih testiranih sevov in se je najbolj prilagodil na rast pri nizkih pH vrednostih. Ostali probiotični sevi (PRO4, PRO1, PRO2, PRO3) pa so si bili glede na rezultate rasti pri nizkih pH vrednostih podobni med seboj. Glede na povprečni zadrževalni čas probiotikov v dvanajstniku 1-2h, bi lahko kot bolj točne rezultate upoštevali rezultate na intervalu 1h, na podlagi katerih lahko sklepamo, da enourna izpostavitev kislemu pH 6,5 bistveno ne prizadene testiranih probiotičnih sevov oz. da ugodno vpliva na njihovo rast.

V primerjavi rasti patogenih sevov *C. glabrata* in *S. cerevisiae* z rastjo probiotičnih sevov lahko v skladu s pričakovanji opazimo razlike v preživelosti. Skoraj nevtralni pH 6,5 je negativno vplival na rast patogenega seva *S. cerevisiae*, ki je imel po 24 urah nizko 48 % stopnjo preživelosti. Kljub temu je imel patogeni sev *C. glabrata* najboljšo odpornost (229 % stopnja preživelosti) v primerjavi z ostalimi sevi, kar sovpada z visoko patogenostjo testiranega seva in zmožnostjo rasti le tega pri vseh kislih testiranih pH vrednostih.



Slika 22: Živost probiotika *S. boulardii* (PRO1-5) v različnih časovnih intervalih pri kislem pH 6,5 ter 37 °C na gojišču CMGM, v primerjavi z živostjo patogenih sevov *S. cerevisiae*, *C. glabrata*.



Slika 23: Stopnja preživelosti probiotika *S. boulardii* (PRO1-5) in patogenih sevov *S. cerevisiae* in *C. glabrata* po 24-urni inkubaciji na 37 °C v kislem pH 6,5 na gojišču CMGM.

#### 4.2.3 Rast probiotika *S. boulardii* pri pH 8

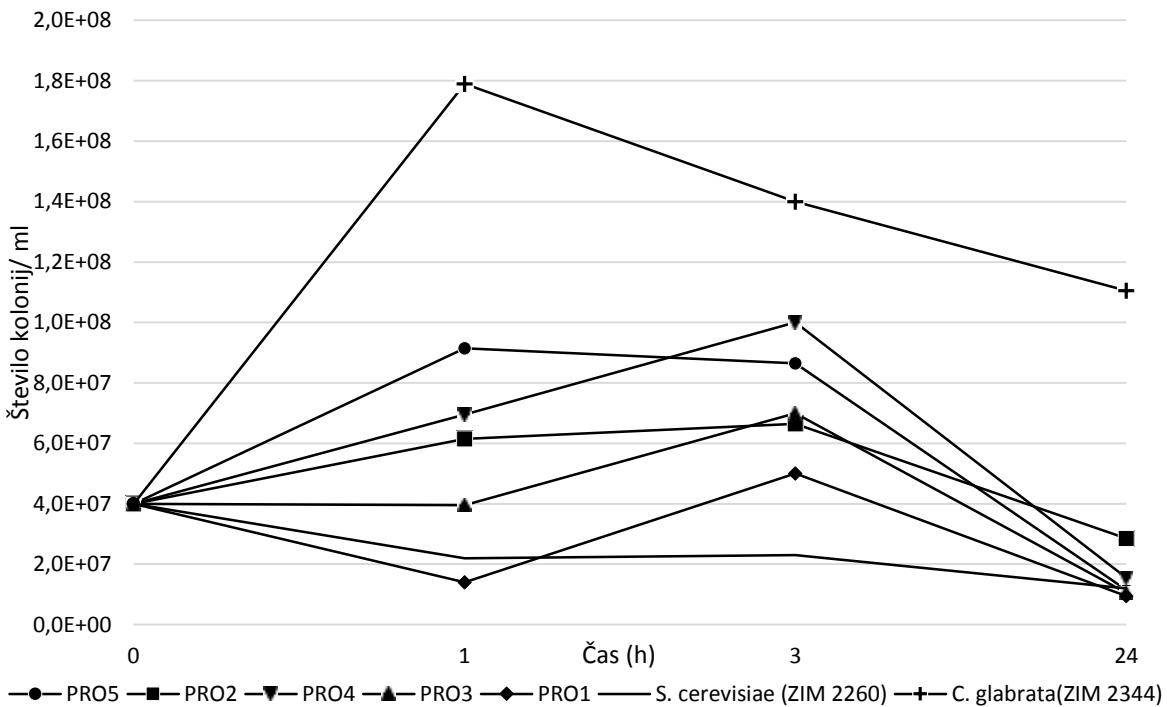
Rast probiotikov *S. boulardii* smo testirali tudi pri bazičnem pH 8, s čimer smo želeli preveriti stopnjo preživetja pri pH, ki je značilen za tanko črevo. Pri prehodu preko dvanajstnika pH v prebavili naraste tudi na pH 8. Tanko črevo kot ciljno mesto delovanja probiotikov tako predstavlja pomemben parameter pri določanju funkcionalnosti probiotika *S. boulardii*.

Število kolonij v testiranih vzorcih smo določili z metodo CFU v časovnih intervalih po opisanem protokolu v poglavju 3.3.2. Metoda CFU, je bila zaradi motnosti medija CMGM primernejša za analizo kot metoda "ImageJ". Pred začetkom poskusa smo koncentracijo testiranih sevov umerili na  $4 \times 10^7$  celic/ml, ter nato po inokulaciji vzorčili v časovnih intervalih (0h, 1h, 3h in 24h).

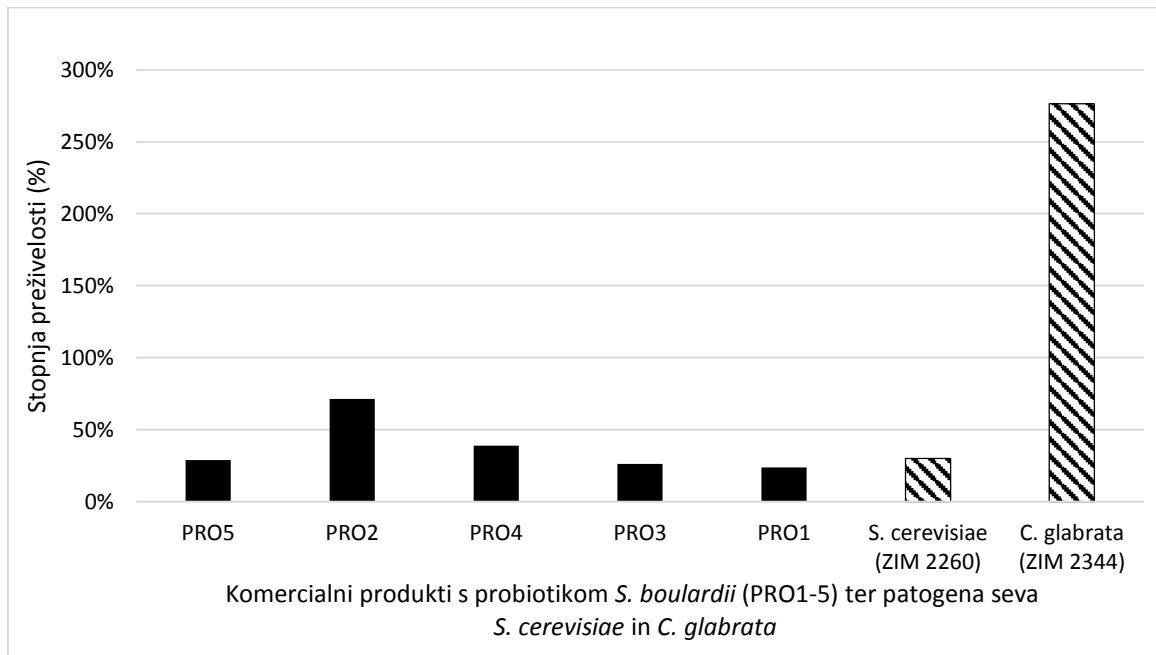
Rezultati preživetja probiotika *S. boulardii* pri bazičnem pH 8 so pokazali (slika 24), da so probiotični sevi najbolj občutljivi na bazični pH 8 v primerjavi z ostalimi testiranimi pH (2, 5 in 6,5). Pri pH 8 so probiotični sevi pokazali najslabšo rast po 24 urah. Rezultati na sliki 24 nam kažejo, da je število celic v vzorcih po 24 urah drastično padlo. Stopnja preživelosti (slika 25) se je tako gibala med 71 % za PRO2 in 24 % za PRO1 s povprečno 37 % stopnjo preživelosti. Za natančneje razlago rezultatov bi morali vzorce večkrat vzorčiti na večjem številu intervalov. Le na ta način bi lahko določili optimalni čas preživetja probiotikov pri bazičnem pH 8.

V primerjavi probiotičnih sevov s patogenima kvasovkama *C. glabrata* in *S. cerevisiae* je stopnja preživelosti drugačna. Kvasovka *S. cerevisiae* je imela slabšo prilagoditev na bazični pH 8 že po 1-urni izpostavitvi v primerjavi z ostalimi sevi. V nasprotju s kvasovko *S.*

*cerevisiae*, je kvasovka *C. glabrata* najbolje prenesla izpostavitev bazičnemu pH v primerjavi z ostalimi probiotičnimi sevi. V primerjavi z vsemi testiranimi vrednostmi pH, je bazični pH najbolj prizadel rast probiotičnih sevov.



Slika 24: Živost probiotika *S. boulardii* (PRO 1-5) v različnih časovnih intervalih pri bazičnem pH 8 na 37 °C v primerjavi z živostjo patogenih sevov (*S. cerevisiae* in *C. glabrata*).



Slika 25: Stopnja preživelosti probiotika *S. boulardii* (PRO1-5) in patogenih sevov *S. cerevisiae* in *C. glabrata* po 24-urni inkubaciji na 37 °C v bazičnem pH 8.

#### **4.2.4 Rast probiotika *S. boulardii* v primerjavi z rastjo patogenih sevov *C. glabrata* in *S. cerevisiae* pri testiranih pH vrednostih.**

Rezultati kažejo na to da je kvasovka *C. glabrata* pri vseh testiranih pH vrednostih rastla bolje kot komercialni probiotični pripravki. To lahko razložimo z visoko patogenostjo seva, ter dobro razvitim prilagoditvenim in obrambnim mehanizmom seva. Patogenost lahko kvasovka doseže le v primeru, da doseže tanko črevo oz. njeno mesto delovanja. Pot do mesta delovanja pa vključuje živost pri različnih pH vrednostih skozi prebavni trakt.

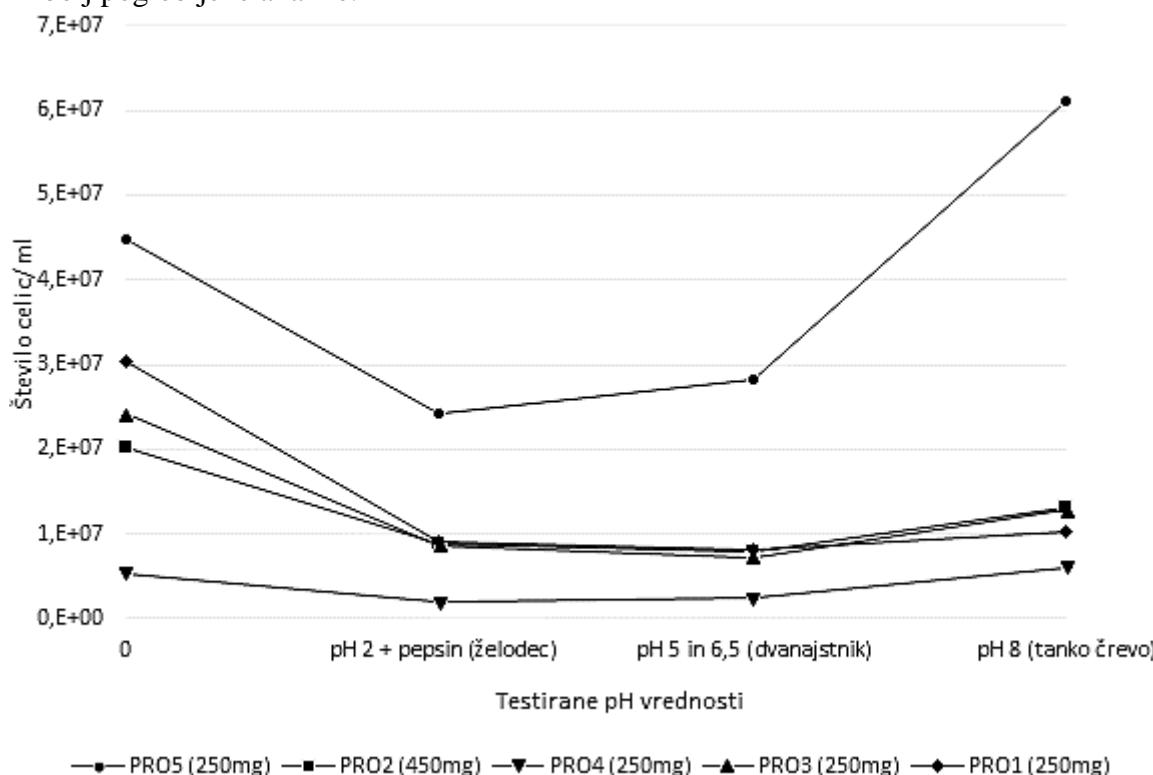
V primerjavi z rastjo patogenega seva *S. cerevisiae* lahko glede na rezultate sklepamo, da imajo probiotični sevi *S. boulardii* boljšo stopnjo preživelosti.

#### **4.2.5 Koncentracija celic v probiotičnih kapsulah, ki bi glede na preživelost pri različnih pH vrednostih dosegla tarčno mesto v tankem črevesju.**

Za določanje koncentracije celic, ki bi glede na preživelost pri različnih pH vrednostih dosegla tarčno mesto v tankem črevesju smo morali najprej definirati čas praznjenja želodca in čas praznjenja tankega črevesja. Zaradi dejstva, da se čas praznjenja želodca in tankega črevesja razlikuje glede na spol, starost ter prehrano smo uporabili povprečni čas. Povprečni čas praznjenja želodca je 1 uro in 30 minut, medtem ko je povprečni čas praznjenja tankega črevesja 4 ure (Hardy in sod., 1988). Pri prikazu rezultatov smo zato upoštevali rezultate povprečnih časov, ki jih kapsula prezivi pri določeni pH vrednosti pri potovanju od zaužitja do tarčnega mesta (tankega črevesa). V skladu s povprečnim časom in našimi rezultati preživetja testiranih probiotičnih sevov pri različnih pH vrednostih, smo se tako odločili, da uporabimo rezultate stopnje preživelosti pri časovnem intervalu 90min pri pH 2, rezultate pri časovnem intervalu 1 ura za pH 5 in pH 6,5 katere smo združili v enotni rezultat (povprečna preživelost pri obeh pH vrednostih na intervalu 1 ura) ter rezultate pri časovnem intervalu 3 ure pri pH 8. Stopnjo preživelosti smo pri tem izračunali glede na število celic v kapsulah testiranih vzorcev določenih z metodo "ImageJ" v točki 5.1. Poleg definiranja časa praznjenja želodca in tankega črevesja moramo za določitev koncentracije celic, ki dosežejo tarčno mesto v tankem črevesju definirati tudi količino tekočine v želodcu in tankem črevesju. Z obzирom na študije spremenjanje tekočine v omenjenih delih prebavil pri ljudeh (Schiller in sod., 2005; Andrews in sod., 2010) na tešče, smo se odločili, da koncentracijo celic določimo glede na količino tekočin v omenjenih delih prebavil. Na tešče smo zato v izračunu uporabili 47 ml količine želodčnega soka in 83 ml količine tekočine v tankem črevesju. Pri izračunu pa smo upoštevali še 100 ml vode za normalno zaužitje kapsule.

Da bi lahko ocenili ali je število celic v kapsulah, ki bi glede na preživelosti pri različnih pH vrednostih prebavila zadostno, potrebujemo podatek za priporočljivo minimalno koncentracijo probiotikov *S. boulardii*, ki so potrebni za pozitivni učinek v črevesju. Trenutno je v literaturi takih podatkov malo, kljub temu pa lahko najdemo nekatere predvidevane minimalne koncentracije probiotikov, ki so potrebne za pozitivno učinkovanje v črevesju, ki se gibljejo med  $10^6$  CFU/ml in vse do  $10^8$  CFU/ml (Kechagia in sod., 2013). Glede na naše rezultate na sliki 26 bi bilo to število večje od  $6,0 \times 10^6$  celic/ml. Pri sevu PRO5 je bilo število celic, ki dosežejo tarčno mesto v tankem črevesju največje in sicer  $6 \times 10^7$ , kar kaže na izjemno učinkovitost te probiotične kapsule. Omenjene ekstrapolacije temeljijo zgolj na enostavnih laboratorijskih eksperimentih pri različnih pH vrednostih. Za

bolj verodostojne ekstrapolacije bi bilo potrebno uporabiti kompleksnejše modele črevesja in bolj poglobljene analize.



Slika 26: Število celic v kapsulah komercialnih probiotikov (PRO1-5), ki bi glede na preživelost pri različnih vrednostih pH prebavnega sistema dosegle tarčno mesto v tankem črevesju.

#### 4.3 INVAZIVNA RAST PROBIOTIKA *S. boulardii*

##### 4.3.1 Invazivna rast probiotika *S. boulardii* pri 37 °C in 39 °C

Invazivna rast komercialnih probiotikov *S. boulardii* predstavlja pomemben faktor za določanje potencialne patogenosti probiotikov. S testiranjem invazivnosti smo preverili sposobnost invazivne rasti testiranih sevov v agar, pri čemer smo merili volumne celokupnega dela kolonij in invazivnega dela kolonij. Invazivnost smo testirali po postopku opisanem v poglavju 3.3.3.

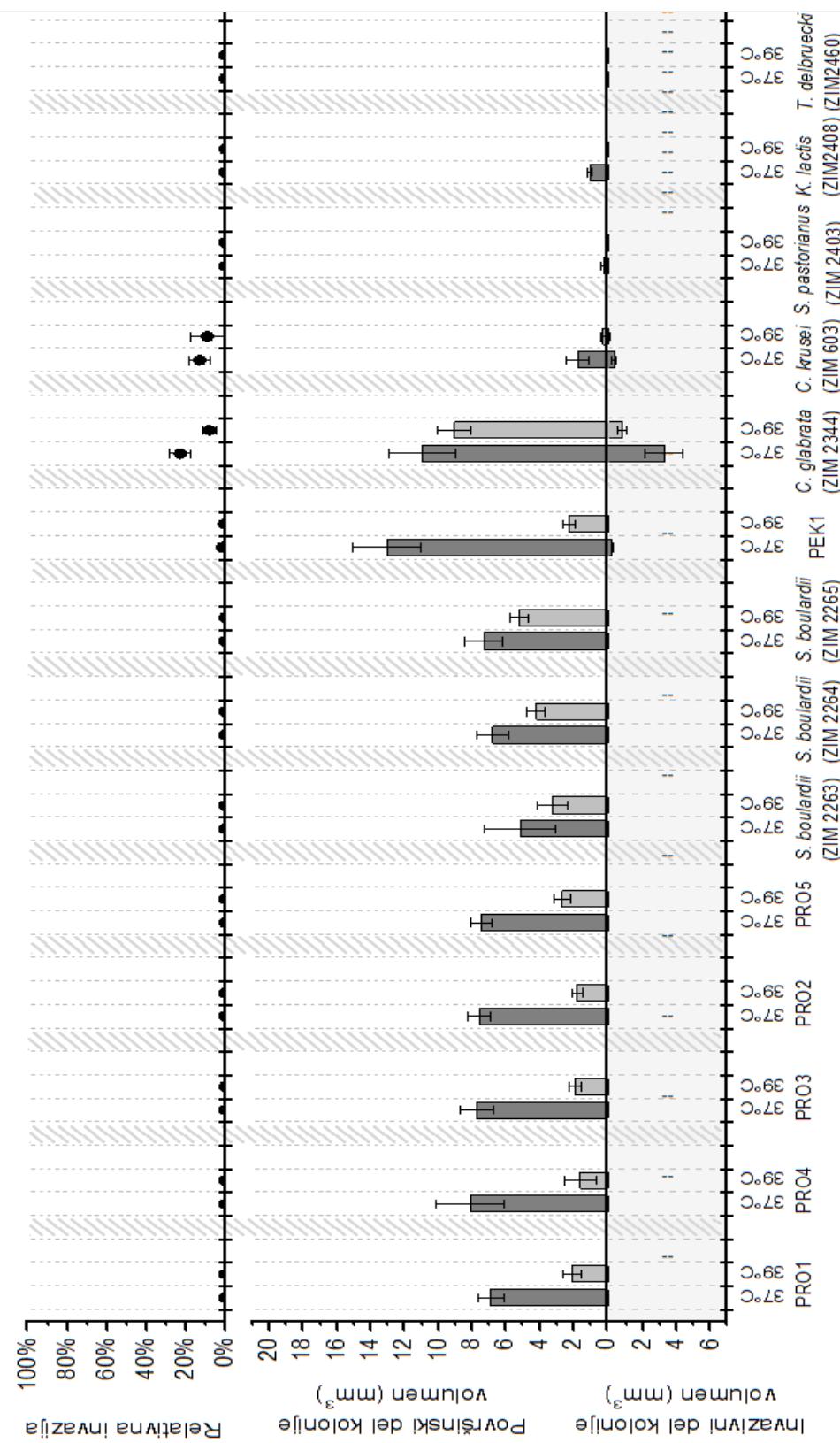
Za referenčne seve smo izbrali 2 patogena seva *C. glabrata* in *C. krusei*, ter 4 potencialne alternative probiotični kvasovki *S. boulardii* in sicer pekovski kvas PEK1, industrijsko pivske kvasovko *S. pastorianus* (ZIM 2203), industrijsko mlečno kvasovko *K. lactis* (ZIM 2408) in industrijsko kvasovko *T. delbrueckii* (ZIM 2460).

Rezultati invazivne rasti v agar (slika 27) kažejo, da testirani probiotični sevi (PRO1-5, ZIM 2263, ZIM 2264 in ZIM 2265) niso invazivni pri 37 °C in 39 °C. Prav tako lahko opazimo, da testirane probiotične kvasovke občutno bolje rastejo pri normalni telesni temperaturi 37 °C kot pri povišani telesni temperaturi 39 °C, ki navadno nastopi v primeru infekcij. Oboji rezultati sovpadajo z našima hipotezama o neinvazivnosti probiotične kvasovke *S. boulardii* ter boljši rasti le te pri 37 °C.

Med izmerjenimi celokupnimi volumni kolonij pred spiranjem je imel pri 37 °C največjo vrednost pekovski kvas PEK1, kjer volumen kolonij znaša  $12,35 \text{ mm}^3 \pm 2 \text{ mm}^3$ , najmanjšo vrednost pa *C. krusei* (ZIM 603)  $1,12 \pm 0,9 \text{ mm}^3$ . Pri 39 °C največji izmerjen volumen kolonij znaša  $9,1 \pm 1,3 \text{ mm}^3$  (*C. glabrata*) najmanjši pa  $0,3 \pm 0,07 \text{ mm}^3$ . Med izmerjenimi invazivnimi volumni kolonij po spiranju je imela pri 37 °C največjo vrednost *C. glabrata*, kjer volumen invazije znaša  $3,3 \pm 0,6 \text{ mm}^3$ , najmanjšo pa pekovski kvas PEK1, kjer volumen invazije znaša  $0,14 \pm 0,07 \text{ mm}^3$ . Pri 39 °C največji izmerjen volumen invazije kolonij znaša  $0,8 \pm 0,3 \text{ mm}^3$  (*C. glabrata*), najmanjši pa  $0,0068 \text{ mm}^3$  (pekovski kvas PEK1).

Referenčna patogena seva *C. krusei* in *C. glabrata* sta glede na rezultate kazala invazivno rast pri obeh testiranih temperaturah. Te rezultati tako potrjujejo primernost uporabljenih metode za potrditev invazivnosti. Pri obeh patogenih sevih smo lahko opazili tudi slabšo rast pri povišani telesni temperaturi 39 °C v primerjavi z normalno telesno temperaturo pri 37 °C. V splošnem je patogena kvasovka *C. glabrata* bolje rastla v primerjavi s probiotičnimi kvasovkami, kar sovpada s patogenostjo seva, medtem ko je *C. krusei* rastla nekoliko slabše. Vredno je tudi izpostaviti pekovsko kvasovko PEK1, ki je kazala rahlo invazivnost pri 37 °C, kar bi bilo lahko sporno s stališča statusa GRAS testirane kvasovke.

Na podlagi rezultatov rasti potencialnih probiotičnih (industrijskih) sevov *S. pastorianus*, *K. lactis*, *T. delbrueckii* pri 37 °C in 39 °C lahko opazimo odsotnost invazivne rasti, kot tudi zelo slabo rast pri testiranih temperaturah. To sovpada tudi z dejstvom, da večina industrijskih sevov raste pri temperaturah do 35 °C. Zaradi omejene rasti pri temperaturah nad 35 °C te sevi tako niso bili primerni za uporabo kot potencialni probiotiki. Zato testirane potencialne probiotike *S. pastorianus*, *K. lactis*, *T. delbrueckii* nismo uporabili za nadaljnje poskuse povezane s probiotično kvasovko *S. boulardii*.



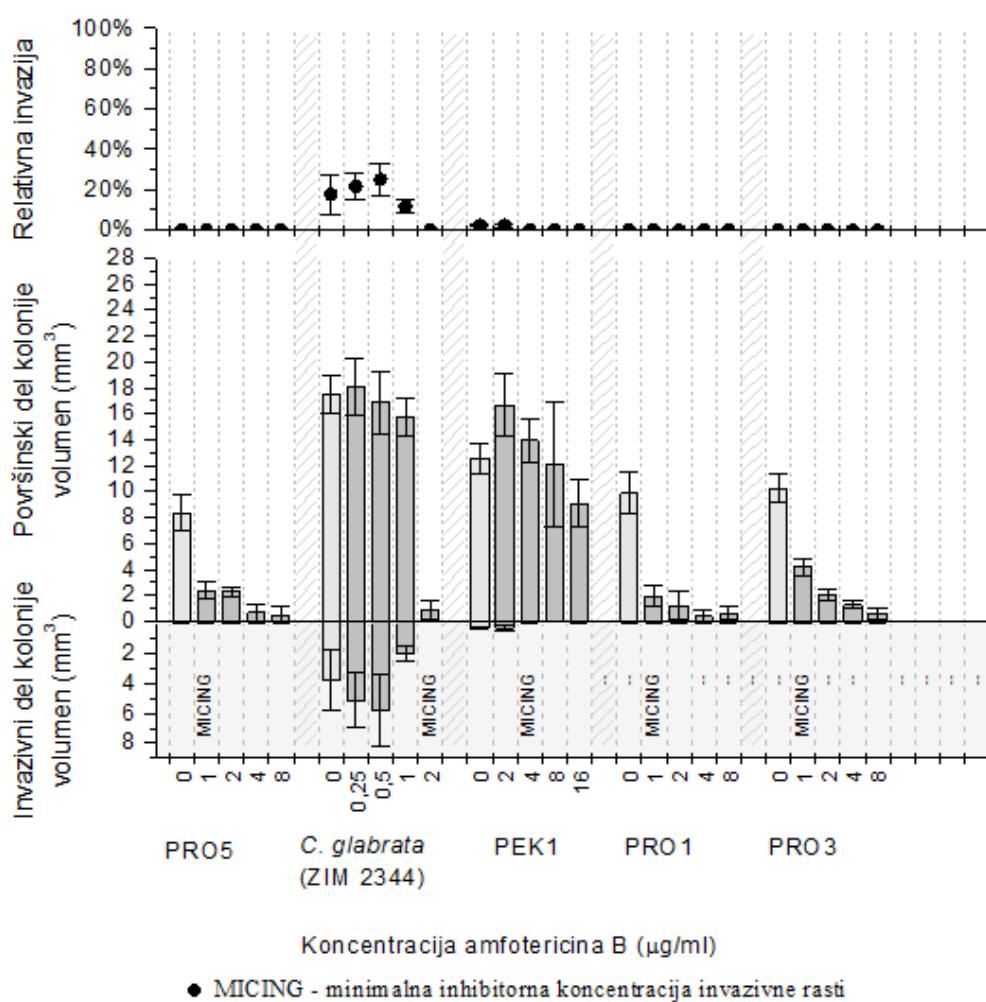
Slika 27: Invazivna rast testiranih sevov komercialnih probiotikov (PRO1-5), potencialnih probiotikov (*S. boulardii*, *S. pastorianus*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*), patogenih kvasovk (*C. glabrata* in *C. krusei*) ter pekovske kvasovke (PEK1) pri 37 °C in 39 °C.

#### **4.3.2 Invazivna rast probiotika *S. boulardii* pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin**

Probiotike smo testirali tudi z metodo določanja vrednosti MICING (minimalna inhibitorna koncentracija invazivne rasti) (Zupan in sod., 2015), pri 37 °C. Testirali smo protiglivične učinkovine flukonazol, itrakonazol, amfotericin B in kaspofungin ter pri tem preverili vpliv protiglivičnih učinkovin na probiotične kvasovke *S. boulardii*. Poskus je potekal po postopku opisanem v poglavju 3.3.3.

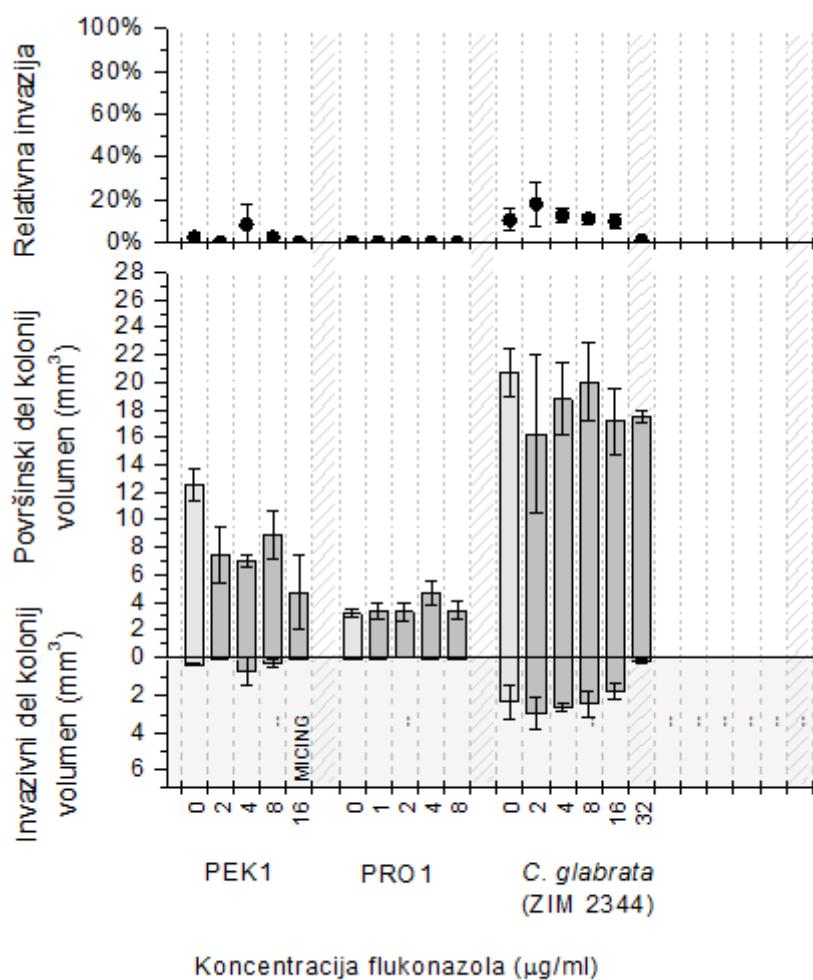
Rezultati invazivnost ob dodatku protiglivičnih učinkovin so predstavljeni na slikah 28-31 za protiglivične učinkovine amfotericin B, flukonazol, itrakonazol in kaspofungin. Kot referenco poskusu smo uporabili patogeni sev *C. glabrata*, ki ima visoko patogenost in kaže odpornost na izbrane protiglivične učinkovine.

Na podlagi rezultatov (slika 28) lahko opazimo, da testirani probiotični sevi (PRO5, PRO1, PRO3) slabše prenašajo rast pri višjih koncentracijah amfotericina B (2 µg/ml) kot patogena kvasovka *C. glabrata*. Pomembno je izpostaviti rast pekovskega kvasa PEK1, ki je imel zelo veliko površinsko rast tudi pri visokih koncentracijah amfotericina B (16 µg/ml). Največji celokupni volumen pred spiranjem pri 2 µg/ml amfotericina B je za to kvasovko znašal 16,6 ± 2,4 mm<sup>3</sup> v primerjavi z 0,8 ± 0,7 mm<sup>3</sup> patogene kvasovke *C. glabrata*. Poleg tega je bil sev PEK1 tudi šibko invaziven pri omenjeni koncentraciji amfotericina B (0,36 ± 0,2 mm<sup>3</sup>). Največja invazivnost 5,8 ± 2,4 mm<sup>3</sup> je bila izmerjena pri patogeni kvasovki *C. glabrata* pri 0,5 µg/ml amfotericina B, medtem ko je bila invazivnost pri testiranih probiotičnih kvasovkah (PRO1, PRO5 in PRO3) odsotna.



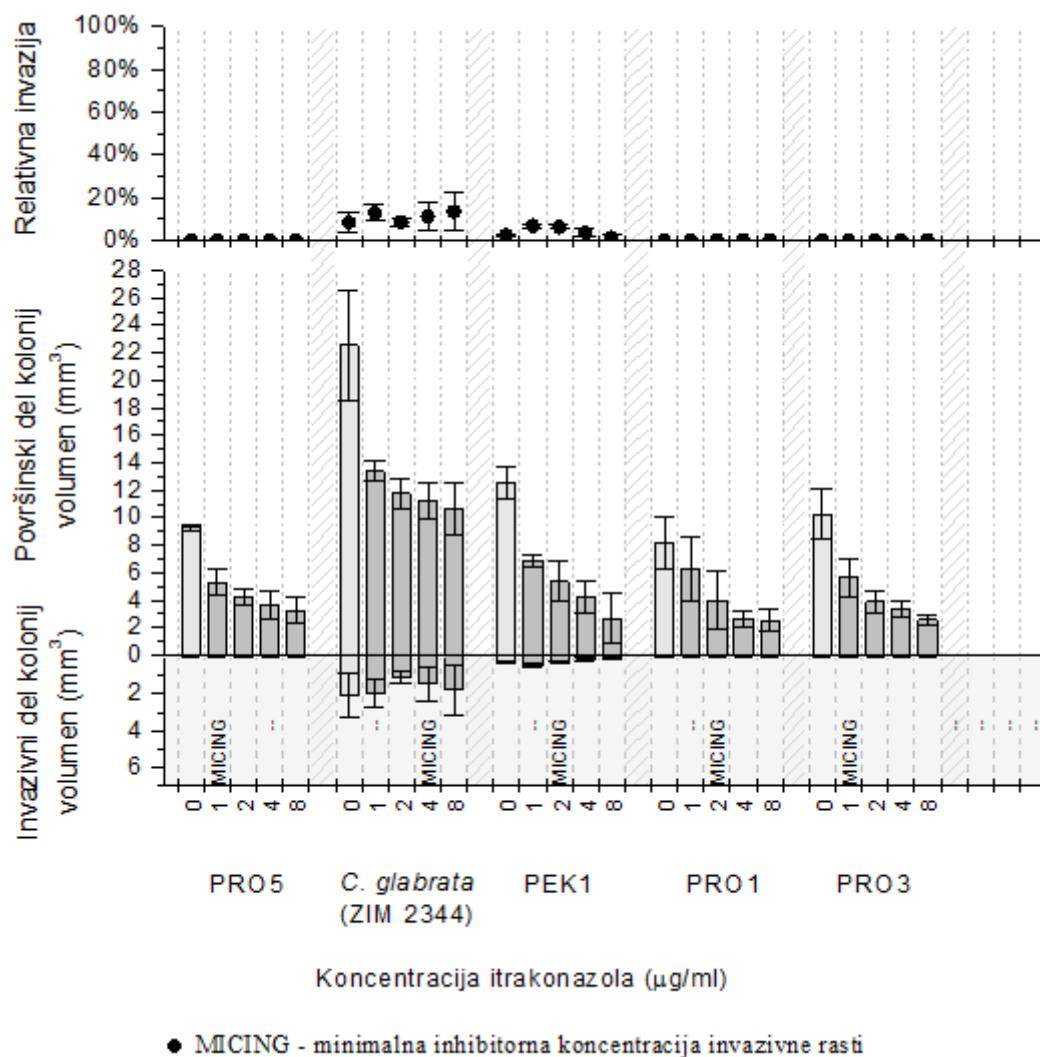
Slika 28: Invazivna rast testiranih sevov (PRO5, PRO1, PRO3, pekovski kvas PEK1 in *C. glabrata*) pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine amfotericin B (µg/ml).

Rezultati površinskih volumnov kolonij od dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine flukonazol (slika 29) pri 37 °C na gojišču YNB so kazali na to, da patogena kvasovka *C. glabrata* površinsko dobro raste pri visokih koncentracijah flukonazola (16 µg/ml, 32 µg/ml), medtem ko testiran probiotični sev PRO1 raste slabše. Površinski volumen patogene kvasovke *C. glabrata* pri 8 µg/ml flukonazola je tako znašal  $20,0 \pm 2,8$  mm<sup>3</sup> v primerjavi z najmanjšo vrednostjo  $3,3 \pm 0,6$  mm<sup>3</sup> probiotične kvasovke PRO1. Rezultati invazivnih volumnov kolonij po spiranju so kazali podobne rezultate. Patogena kvasovka *C. glabrata* je bila z volumnom  $3,0 \pm 0,8$  mm<sup>3</sup> najbolj invazivna med testiranimi sevi. Pekovski kvas PEK1 je imel z  $0,31 \pm 0,07$  mm<sup>3</sup> manjšo invazivnost, medtem ko pri testirani probiotični kvasovki PRO1 invazivna rast ni bila opazna.



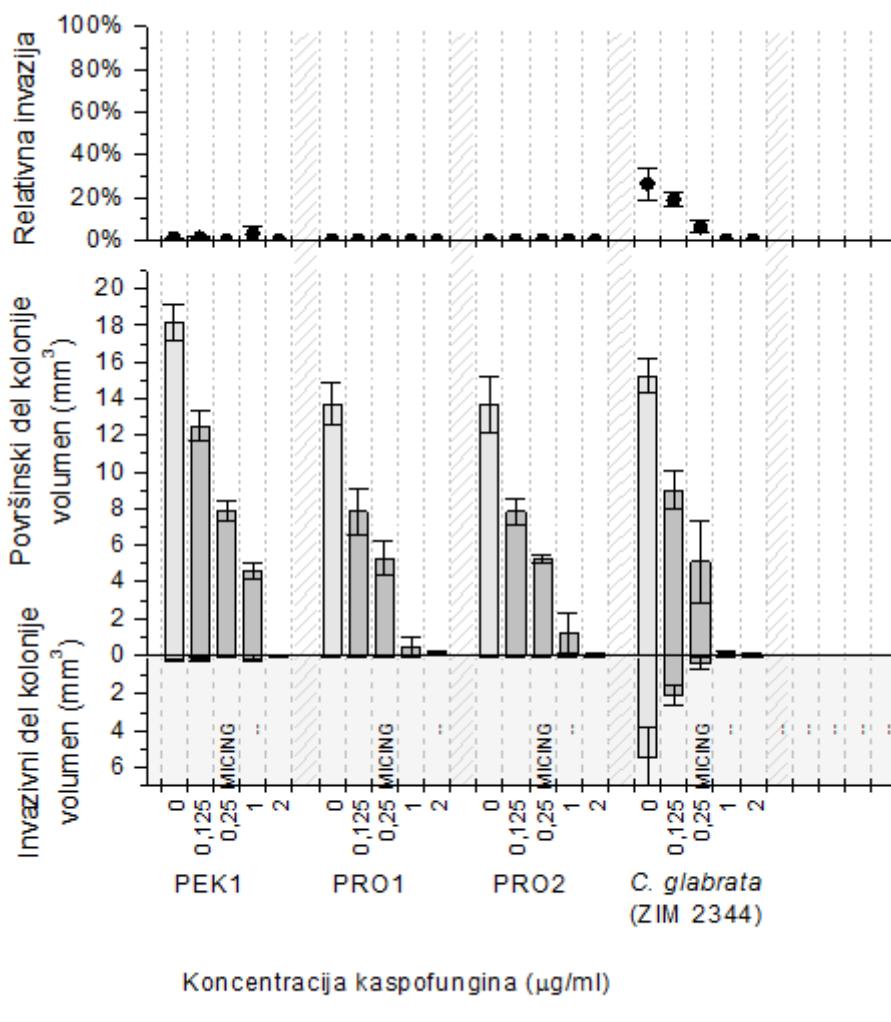
Slika 29: Invazivna rast testiranih sevov (PRO1, pekovski kvas PEK1 in *C. glabrata*) pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine flukonazol ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Glede na azolno skupino, protiglivična učinkovina itrakonazol (slika 30), kaže podobne rezultate kot flukonazol. Rezultati površinskih volumnov kolonij pred spiranjem so kazali na to, da najboljše raste referenčna patogena kvasovka *C. glabrata* in sicer tudi ob visokih koncentracijah itrakonazola (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Površinski volumen kolonij pred spiranjem patogene kvasovke *C. glabrata* pri 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  itrakonazola je znašal  $10,6 \pm 1,9 \text{ mm}^3$  v primerjavi z najmanjšo vrednostjo  $2,5 \pm 0,3 \text{ mm}^3$  probiotične kvasovke PRO3. Glede na rezultate testirani probiotični sevi PRO1, PRO3 in PRO5 niso bili invazivni. Patogena kvasovka *C. glabrata* je imela dobro invazivnost tudi pri visoki koncentraciji itrakonazola (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), medtem ko smo lahko majhno invazivnost opazili tudi pri pekovski kvasovki PEK1 pri nižjih koncentracijah itrakonazola.



Slika 30: Invazivna rast testiranih sevov (PRO1, PRO3, PRO5, pekovski kvas PEK1) in *C. glabrata* pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protigliivične učinkovine itrakonazol (µg/ml).

Rezultati invazivne rasti testiranih sevov od dodatku različnih koncentracij protigliivične učinkovine kaspofungin (slika 31) so kazali na to, da je z naraščanjem koncentracij kaspofungina (od 0 – 2 µg/ml), površinska rast skoraj linearno padala pri vseh testiranih sevih. Na podlagi slike lahko tako sklepamo, da testirani sevi enako dobro rastejo pri vseh testiranih vrednostih. Kljub temu pa testirana probiotična seva PRO1 in PRO2 nista bila invazivna, kar se je odražalo le v površinski rasti kolonije. Patogena kvasovka *C. glabrata* je imela pričakovano največji invazivni volumen po spiranju, ki je znašal  $8,9 \pm 1,0$  mm<sup>3</sup> pri koncentraciji kaspofungina 0,125 µg/ml. Poleg patogene kvasovke *C. glabrata* smo lahko invazivnost opazili tudi pri pekovski kvasovki PEK1.



Slika 31: Invazivna rast testiranih sevov (PRO1, PRO2, pekovski kvas PEK1 in *C. glabrata*) pri 37 °C ob dodatku različnih koncentracij protiglivične učinkovine kaspofungin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

#### 4.3.3. Primernost probiotične kvasovke *S. boulardii* s stališča invazivnosti

Testi invazivnosti ob dodatku različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin (amfotericin B, flukonazol, itrakonazol in kaspofungin) pri 37 °C kažejo, da testirani probiotični sevi (PRO1-5) niso invazivni v agar, kar se odraža v površinski rasti kolonij. To je tudi skladno z našo hipotezo o neinvazivnosti probiotičnih kvasovk. Iz stališča invazivne rasti kot virulentnega faktorja, je *S. boulardii* tako primerna kvasovka. Kljub temu je pomembno izpostaviti, da pekovski kvas PEK1, kaže dobro odpornost na vse testirane protiglivične učinkovine pri površinski rasti kolonij ter, da smo tekom dela v laboratoriju opazili delno invazivnost komercialnega probiotika PRO2 po 14 dneh na 24 °C na gojišču SAB.

#### 4.4 PROTIGLIVIČNA ODPORNOST PROBIOTIKA *S. boulardii*

Z določanjem odpornosti probiotika *S. boulardii* na protiglivične učinkovine s testom standarda »Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M27-A3) (CLSI, 2008; CLSI, 2010) smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) testiranih protiglivičnih učinkovin.

Pri določanju odpornosti na protiglivične učinkovine smo s pomočjo optičnega čitalca merili število preživelih celic po določenih dneh inkubacije na mirkotitrskih ploščah s 96 jamicami. Protiglivično odpornost smo testirali po postopku opisanem v poglavju 3.3.4.

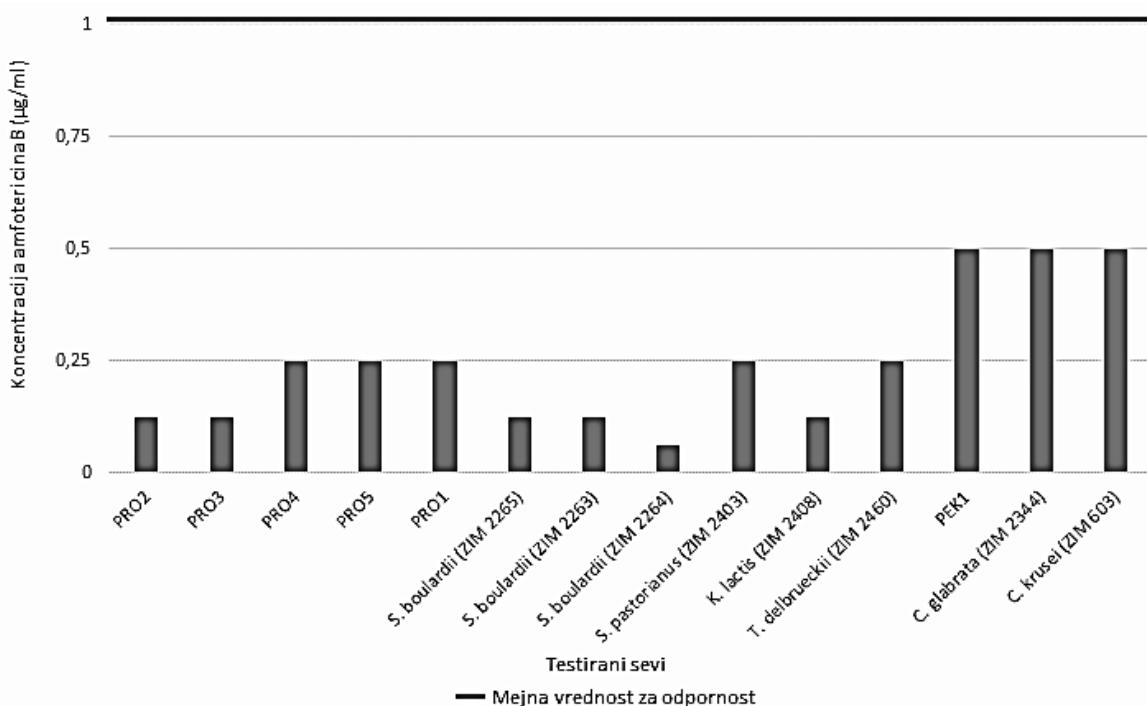
Test standarda CLSI definira koncentracije, na podlagi katerih lahko glede na MIC testiran sev opredelimo kot občutljiv, občutljiv v odvisnosti od koncentracije protiglivične učinkovine, delno občutljiv, odporen in neobčutljiv (prikazano v preglednici 12).

Preglednica 12: Točno določene meje standarda CLSI (CLSI, 2008; CLSI, 2010), ki definirajo občutljivost in odpornost kvasovk na protiglivične učinkovine.

	MIC	Občutljiv (O)	Občutljiv v odvisnosti od odmerka (O-DD)	Delno občutljiv (I)	Odporen (R)	Neobčutljiv (NO)
Amfotericin B	0				$\geq 1$	
Itrakonazol	2	$\leq 0.125$	0.25-0.5	-	$\geq 1$	-
Flukonazol	2	$\leq 8$	16-32	-	$\geq 64$	-
Kaspofungin	2	$\leq 2$	-	-	-	$> 2$

##### 4.4.1 Odpornost probiotika *S. boulardii* na protiglivično učinkovino amfotericin B

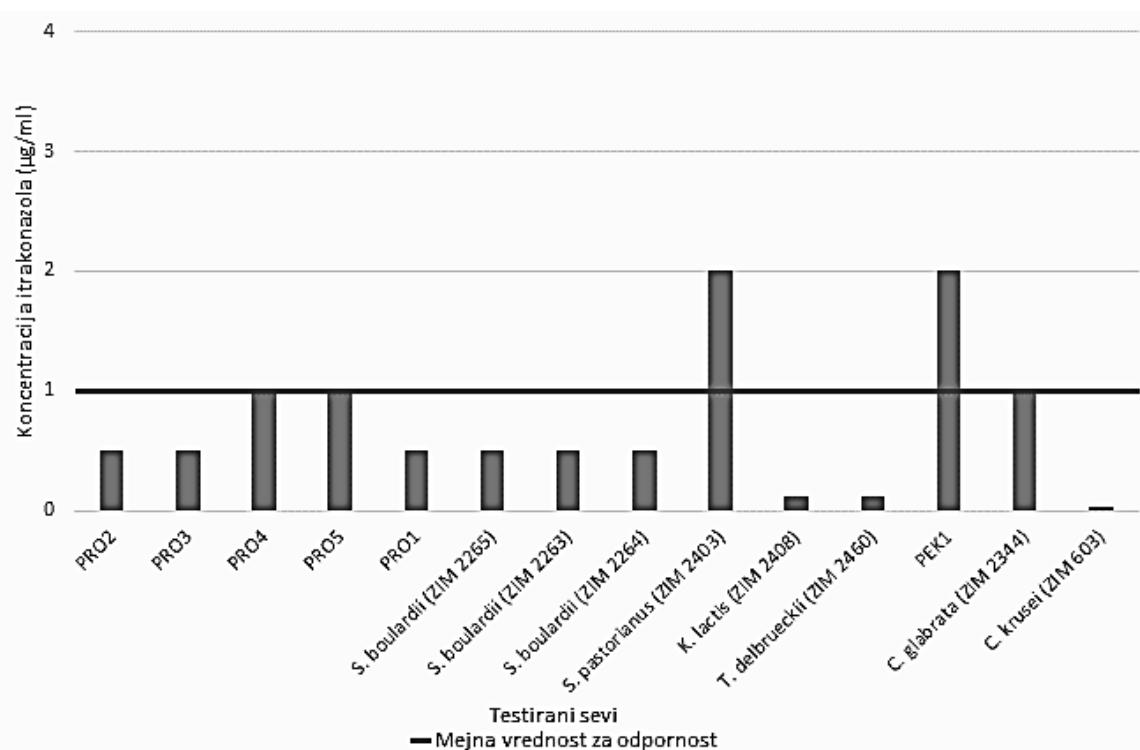
Rezultati vrednosti MIC testiranih sevov kažejo na to, da nobeden od testiranih sevov ni bil zmožen rasti pri 1 µg/ml amfotericina B, ki predstavlja mejno vrednost za odpornost seva (črna črta na slikah). Na sliki 32 lahko opazimo, da je večina testiranih probiotičnih sevov *S. boulardii* rastla med 0,125 µg/ml in 0,25 µg/ml amfotericina B, kar kaže na odpornost probiotikov *S. boulardii* na to protiglivično učinkovino. Večjo odpornost smo pričakovano opazili pri patogenih sevih *C. glabrata* in *C. krusei*, ki sta uspešno rastla tudi pri 0,5 µg/ml protiglivične učinkovine amfotericin B. Presenetljivo je, da je tudi pekovska kvasovka PEK1, uspešno rastla pri 0,5 µg/ml, kar priča o večji odpornosti v primerjavi z ostalimi testiranimi probiotičnimi sevi.



Slika 32: Vrednost MIC komercialnih probiotikov (PRO1-5), potencialnih probiotikov (*S. boulardii*, *S. pastorianus*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*), patogenih kvasovk (*C. glabrata* in *C. krusei*) ter pekovske kvasovke (PEK1) za protiglivični učinkovino amfotericin B. Odebujena črta označuje mejno vrednost za odpornost seva.

#### 4.4.2 Odpornost probiotika *S. boulardii* na protiglivično učinkovino itrakonazol

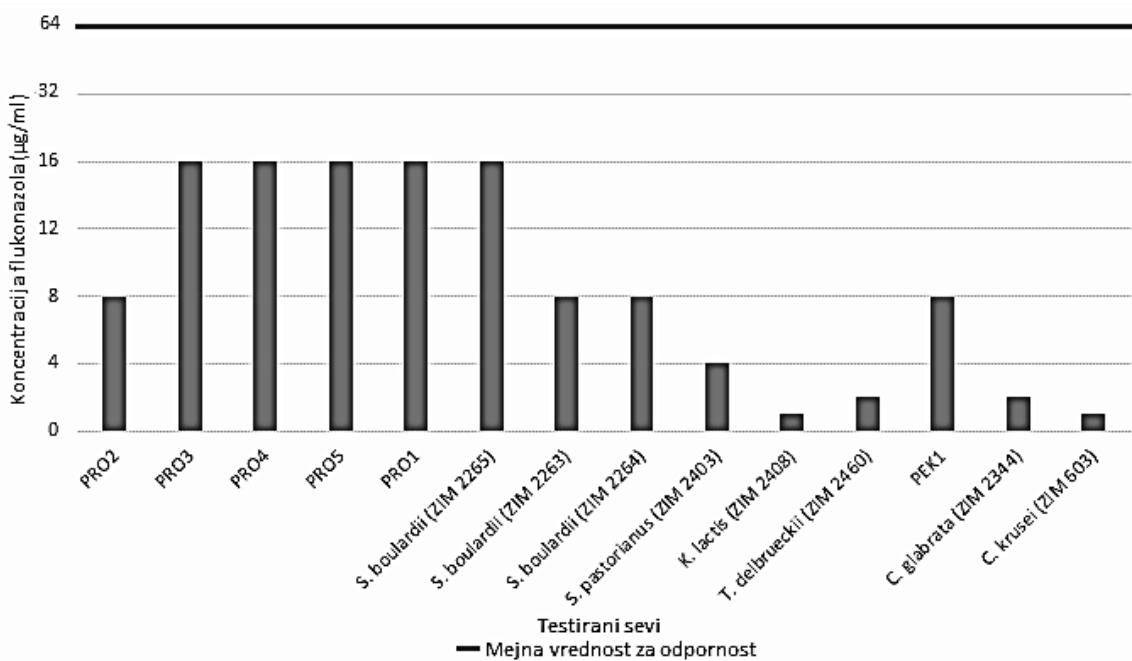
Vrednost MIC testiranih sevov za protiglivično učinkovino itrakonazol (slika 33), kažejo na to, da so testirani probiotični sevi *S. boulardii* občutljivi na protiglivično učinkovino itrakonazol in je pri večini vrednosti MIC dosežena pri 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  itrakonazola. Odpornost v odvisnosti od odmerka sta kazala vzorca PRO5 in PRO4, kar priča o genetski raznolikosti testiranih probiotičnih sevov *S. boulardii*. Odpornost v odvisnosti od odmerka je kazala tudi patogena kvasovka *C. glabrata*, medtem ko je skrb vzbujajoče rezultate kazala pekovska kvasovka PEK1, ki je vrednost MIC doseglila šele pri 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  itrakonazola, zaradi česar smo jo lahko definirali kot odporno (črna linija pri 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  predstavlja mejno vrednost za odpornost).



Slika 33: Vrednost MIC komercialnih probiotikov (PRO1-5), potencialnih probiotikov (*S. boulardii*, *S. pastorianus*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*), patogenih kvasovk (*C. glabrata* in *C. krusei*) ter pekovske kvasovke (PEK1) za protigliivično učinkovino itrakonazol. Odebeljena črna črta označuje mejno vrednost za odpornost seva.

#### 4.4.3 Odpornost probiotika *S. boulardii* na protigliivično učinkovino flukonazol

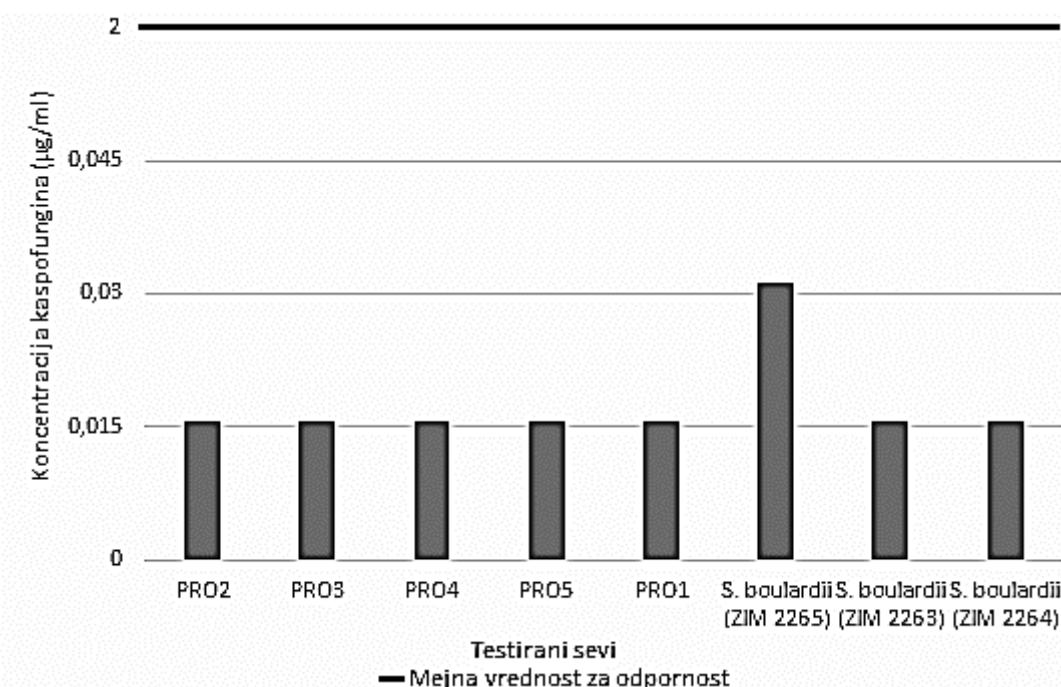
Ob pomoči slike 34, lahko hitro opazimo, da noben od testiranih sevov ni bil odporen, saj noben ni presegal mejne vrednosti pri 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  flukonazola. Glede na rezultate lahko sklepamo, da so probiotiki *S. boulardii* občutljivi na protigliivično učinkovino flukonazol v odvisnosti od odmerka, saj so se vrednosti MIC gibale med 8 in 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . V nasprotju s pričakovanji sta patogeni kvasovki *C. glabrata* in *C. krusei* ter pekovska kvasovka PEK1 dosegli nižjo vrednost MIC, kot probiotična kvasovka *S. boulardii*.



Slika 34: Vrednost MIC komercialnih probiotikov (PRO1-5), potencialnih probiotikov (*S. boulardii*, *S. pastorianus*, *K. lactis*, *T. delbrueckii*), patogenih kvasovk (*C. glabrata* in *C. krusei*) ter pekovske kvasovke (PEK1) za protiglivično učinkovino flukonazol. Odebeljena črna črta označuje mejno vrednost za odpornost seva.

#### 4.4.4 Odpornost probiotika *S. boulardii* na protiglivično učinkovino kaspofungin

Rezultati na sliki 35 kažejo, na to da so bili vsi testirani sevi *S. boulardii* občutljivi na protiglivično učinkovino kaspofungin. Mejna vrednost za odpornost je pri kaspofunginu postavljena pri  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ , vendar lahko glede na naše rezultate hitro opazimo, da je že majhna koncentracija kaspofungina ( $0,031 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) zavrla rast testiranih probiotičnih sevov za več kot 50 %. Na podlagi rezultatov bi lahko tako trdili, da je protiglivična učinkovina kaspofungin najbolj uspešna v boju s testiranimi probiotičnimi sevi v primeravi z ostalimi testiranimi protiglivičnimi učinkovinami.



Slika 35: Vrednost MIC komercialnih probiotikov (PRO1-5) in potencialnih probiotikov (*S. boulardii*) za protiglivično učinkovino kaspofungin. Odebeljena črna črta označuje mejno vrednost za odpornost seva.

#### 4.4.5 Sevi odporni na testirane protiglivične učinkovine

Testirana referenčna patogena seva *C. glabrata* in *C. krusei* sta pričakovano kazala visoko odpornost na testirane protiglivične učinkovine. Še posebej opazna je bila večja odpornost na protiglivično učinkovino amfotericin B v primerjavi z ostalimi testiranimi probiotičnimi sevi. Testirani probiotični sevi *S. boulardii* po večini niso bili odporni na testirane protiglivične učinkovine, izjemi sta bila seva PRO5 in PRO4, ki sta dosegla mejno vrednost odpornosti pri protiglivični učinkovini itrakonazol. V nasprotju s pričakovanji je pekovska kvasovka PEK1 pokazala izredno visoko odpornost na testirani protiglivični učinkovini amfotericin B in itrakozanol in je bila po odpornosti primerljiva s testiranimi patogenimi sevi *C. glabrata* in *C. krusei*.

#### 4.4.6 Posebnosti pri določanju odpornosti na protiglivične učinkovine

Pri določanju odpornosti testiranih sevov na protiglivične učinkovine s testom standarda CLSI so se na začetku poskusa pojavile težave, saj probiotične kvasovke *S. boulardii* niso bile zmožne rasti na standardnem gojišču RPMI, ki je predpisano za standard CLSI. Razloga za nezmožnost rasti v času študije nismo uspeli definirati, problem pa bi bil lahko predmet nadaljnjih biokemijskih raziskav. Pri reševanju opisane težave smo, namesto gojišča RPMI testirali gojišča YNB, YPD in SAB. Pri tem smo primerjali vrednosti MIC patogenih sevov *C. glabrata* in *C. krusei* na standardnem gojišču RPMI z vrednostjo MIC na testiranih gojiščih (preglednica 13). Enako vrednost MIC referenčnih patogenih sevov smo pri tem dosegli na gojišču SAB, na katerem so uspešno rastli vsi testirani probiotični sevi *S. boulardii*. Na podlagi rezultatov smo se nato odločili, da test standarda CLSI za testirane probiotične seve opravimo na gojišču SAB, ki se je že izkazal za dobro alternativo gojišču RPMI (Chand in Ghannoum, 2012; Stopiglia in sod., 2012).

Preglednica 13: Primerjava vrednosti MIC testiranih protigliivičnih učinkovin na gojišču SAB in RPMI.

	Vrednost MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
Gojišče + protigliivična učinkovina	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
RPMI + Apmhotericin B	0,5	0,5
RPMI + flukonazol	2	1
RPMI + itrakonazol	1	0,03
SAB + Apmhotericin B	0,5	0,5
SAB + flukonazol	2	1
SAB + itrakonazol	1	0,03

V nadaljevanju smo zaradi menjave standardnega medija RPMI z gojiščem SAB po naključju prišli do še enega opažanja. Protigliivična učinkovina kaspofungin je bila do 16x bolj učinkovita na gojišču SAB, kot na gojišču RPMI. To smo ugotovili ob testiranju rasti referenčnih sevov *C. glabrata* in *C. krusei* na obeh gojiščih. Zaradi presenetljivih rezultatov smo se izven okvirjev zastavljenega dela odločili tudi stestirati rast patogenih sevov kvasovk *C. glabrata* in *S. cerevisiae* (ZIM 2389, ZIM 2509, ZIM 9909), ki so v predhodnih raziskavah pokazali največjo odpornost na protigliivično učinkovino kaspofungin, na gojišču SAB ob dodatku Capsofungina (preglednica 14). Rezultati so bili presenetljivi, saj je bila protigliivična učinkovina kaspofungin do 16x bolj učinkovita na gojišču SAB, kot pa na gojišču RPMI.

Preglednica 14: Primerjava vrednosti MIC patogenih sevov, ki kažejo visoko odpornost na protigliivično učinkovino kaspofungin na gojišču SAB in RPMI.

	Vrednost MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )				
Gojišče + protigliivična učinkovina	ZIM 2344	ZIM 603	ZIM 2389	ZIM 2509	ZIM 9909
RPMI + kaspofungin	2	2	0,03125	1	1
SAB + kaspofungin	0,01563	0,125	0,0125	0,01536	0,01563

Kljub temu, o razlogih za povečano učinkovitost kaspofungina v kombinaciji z gojiščem SAB lahko le ugibamo. Če primerjamo sestavo gojišč SAB in RPMI (preglednici 15 in 16), lahko najdemo te razlike:

Preglednica 15: Sestava gojišča SAB (Sigma-Aldrich, 2015b)

Mikološki pepton (10 g/l)
Dekstroza (20 g/l)
Voda (1 l)

Preglednica 16: Sestava gojišča RPMI (Sigma-Aldrich, 2015a)

Anorganske soli (g/l)	Aminokisline (g/l)	Aminokisline (g/l)	Vitamini (g/l)	Ostalo (g/l)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (0,1)	L-Arginin (0,2)	L-Leucin (0,05)	D-Biotin (0,0002)	D-glukoza (4,5)
MgSO <sub>4</sub> (0,04)	L-Aspargin·H <sub>2</sub> O (0,05)	L-Lizin·HCl (0,04)	Holin klorid (0,003)	Glutation (0,001)
KCl (0,4)	L-Aspartatna kislina (0,02)	L-Metionin (0,015)	Folna kislina (0,001)	HEPES (2,38)
NaHCO <sub>3</sub> (1,5)	L-Cistein·2HCl (0,06)	L-Fenilalanin (0,015)	Mio-Inositol (0,03)	Fenol rdeče (0,005)
NaCl (6,0)	L-Glutaminska kislina (0,02)	L-Prolin (0,02)	Nikotinamid (0,001)	Natrijev piruvat (0,1)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,8)	L-Glutamin (0,3)	L-Serin (0,03)	Hemikalcij (0,0002)	MOPS (34,5)
	Glicin (0,01)	L-Treonin (0,02)	Piridoksin·HCl (0,001)	L-glutamin (0,3)
	L-Histidin (0,01)	L-Triptofan (0,005)	Riboflavin (0,0002)	Voda (1)
	Hidroksil-L-Prolin (0,02)	L-Tirozin·2Na·2H <sub>2</sub> O (0,02)	Tiamin·HCl (0,001)	
	L-Izoleucin (0,05)	L-Valin (0,02)	Vitamin B-12 (0,000005)	

Iz preglednic 15 in 16 lahko glede na sestavo gojišča SAB in RPMI sklepamo, da ima gojišče SAB boljšo hranilno sestavo saj vsebuje veliko količino dekstroze in peptona, ki sta zelo pomembna za rast kvasovk v nasprotju z gojiščem RPMI, ki je glede na hranilno sestavo slabše. Ob primerjavi lahko tudi opazimo, da definirano gojišče RPMI uporablja tudi pufern sistem MOPS (3-(N-morfolino) propansulfonska kislina), ki služi uravnavi pH vrednosti. V preteklosti so pri testiranju rasti filamentoznih gliv v hranilno različno bogatih gojiščih že pokazali, da je rast filamentoznih gliv na bogatem gojišču SAB občutno boljša kot rast na gojišču RPMI (Meletiadis in sod., 2001). Dodatno so z eksperimenti, v preteklosti dokazali, da je *in vitro* aktivnost nekaterih protiglivičnih učinkovin (mikonazolov) večja, pri uporabi bogatejšega medija (Van Den Bossche in sod., 1975). Iz zgoraj navedenega, bi lahko ugibali, da je večja aktivnost protiglivične učinkovine kaspofungin povezana z občutno boljšo hranilno sestavo gojišča SAB.

#### 4.4.7 Primerjava vrednosti MIC določene s testom invazivne rasti v agar ter testom standarda CLSI.

Vrednost MICING izmerjena s testom invazivne rasti v agar je glede ne rezultate višja kot vrednost MIC določena s testom standarda CLSI (prikazano v preglednici 17).

Preglednica 17: Primerjava MIC in MICING vrednosti testiranih sevov (*C. glabrata*, pekovski kvas PEK 1 in probiotična kvasovka PRO 1), določene s testom invazivne rasti v agar (INV) ter testom standarda CLSI.

MIC vrednost (µg/ml)	Testirani sevi		
	<i>C. glabrata</i>	PEK1	PRO1
Amfotericin B (INV)	2	16	2
Amfotericin B (CLSI)	0,5	0,5	0,25
Flukonazol (INV)	32	16	8
Flukonazol (CLSI)	2	8	16
Itrakonazol (INV)	4	2	2
Itrakonazol (CLSI)	1	2	0,5
Kaspofungin (INV)	0,25	0,25	0,25
Kaspofungin (CLSI)	0,01563	0,01563	0,01563

#### 4.5 MODULATORNI UČINKI (SINERGIZEM/ANTAGONIZEM) MEDICINSKIH UČINKOVIN NA OBČUTLJIVOST SEVOV *S. boulardii* NA PROTIGLIVIČNE UČINKOVINE

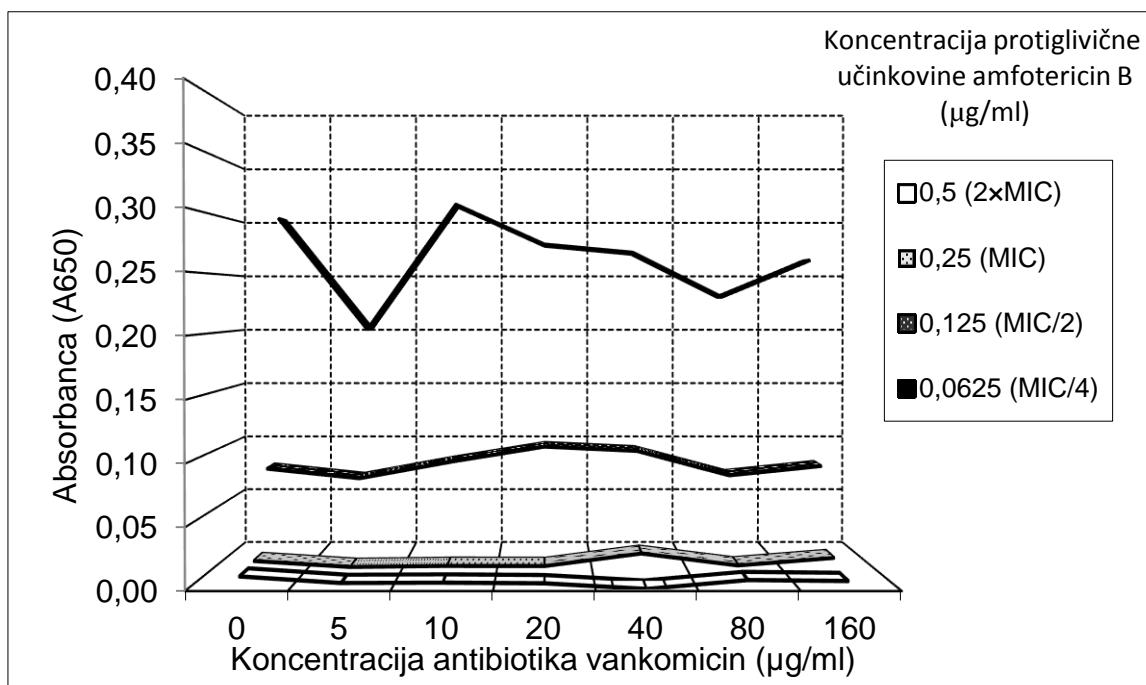
Probiotična kvasovka *S. boulardii* je največkrat predpisana pacientom z oslabljenim imunskim sistemom za preprečevanje z antibiotiki povzročene diareje in za izboljšanje imunskega sistema. Taki pacienti bi lahko v primeru glivne okužbe poleg protiglivične učinkovine še vedno prejemali terapevtske imunosupresante kot sta MPA in FK506 ali npr. antibiotik vankomicin. Testiranje modulatornih učinkov (sinergizem/antagonizem) medicinskih učinkovin na občutljivost sevov *S. boulardii* na protiglivične učinkovine predstavlja tako pomemben test za določanje koncentracije protiglivične učinkovine, ki bi jo bilo potrebno uporabiti pri določenem pacientu glede na terapevtska zdravila, ki jih prejema.

Pri določanju modulatornih učinkov medicinskih učinkovin na občutljivost sevov na protiglivične učinkovine smo s pomočjo optičnega čitalca merili število preživelih celic po določenih dneh inkubacije na mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami. Modulatorne učinke smo nato določili po postopku opisanemu v poglavju 3.3.5.

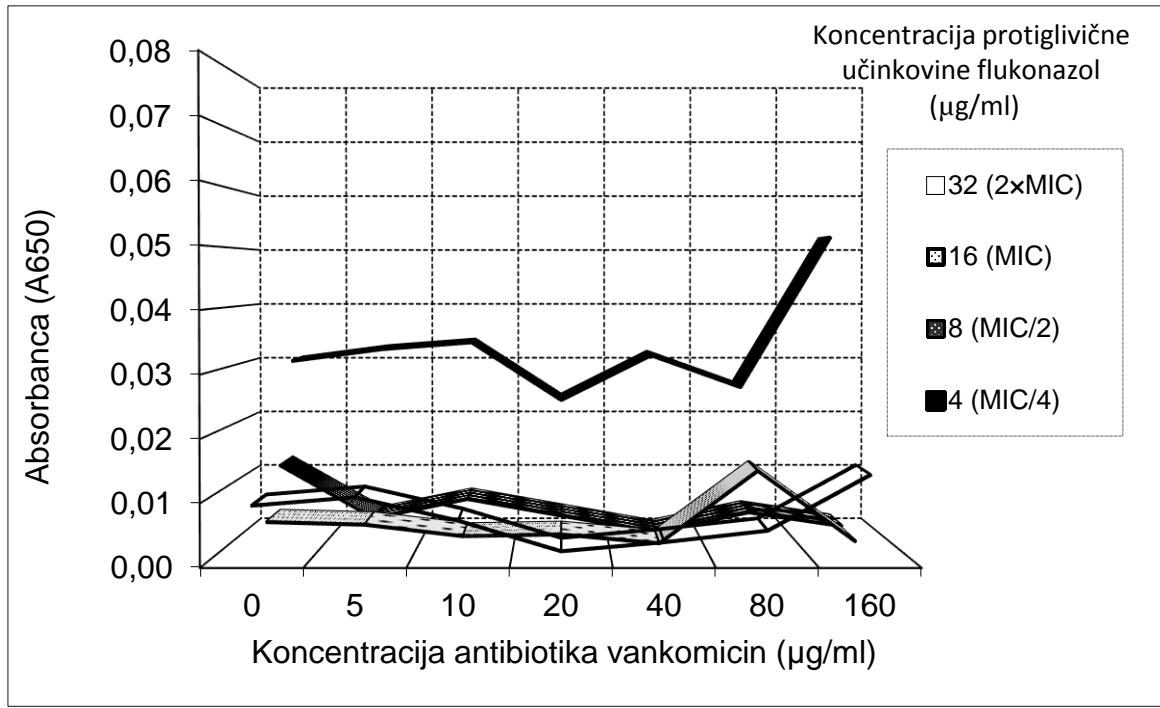
##### 4.5.1 Modulatorni učinki antibiotika vankomicina na rast *S. boulardii* ob dodatku protiglivičnih učinkovin amfotericin B, flukonazol in itrakonazol.

Modulatorni učinek (sinergizem/antagonizem) medicinske učinkovine vankomicin, smo v skladu s protokolom pod točko 3.3.5 določili v primeru, če se je vrednost MIC testiranega seva zmanjšala ali povečala za faktor 2, oziroma smo z optičnim čitalcem zaznali spremenjeno vrednost MIC.

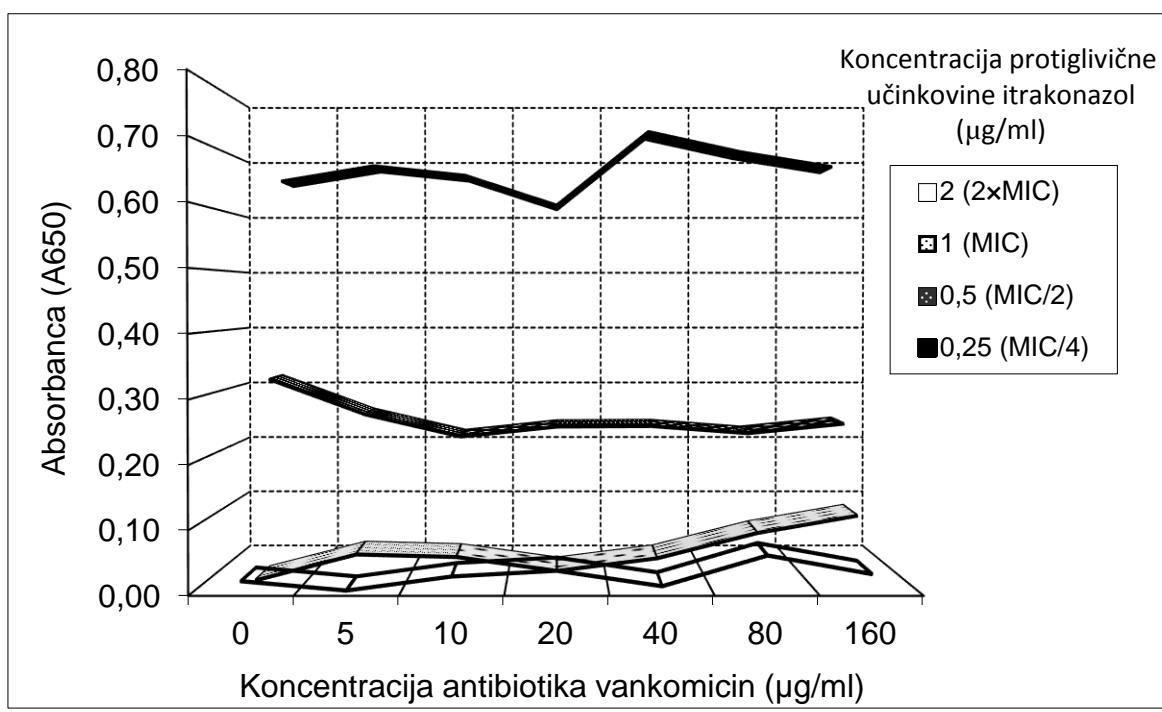
Kot je razvidno iz slik 36, 37 in 38 antibiotik vankomicin ob dodatku protiglivičnih učinkovin amfotericin B, flukonazol in itrakonazol ni imel vpliva na delovanje omenjenih protiglivičnih učinkovin proti *S. boulardii*. Na slikah se to kaže v tem, da se krivulje rasti testiranega probiotičnega seva PRO5 pri različnih koncentracijah testiranih protiglivičnih učinkovin (2xMIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) z naraščanjem koncentracije antibiotika vankomicina bistveno niso spremajale.



Slika 36: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine vankomicin (antibiotik) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO5) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protigliivične učinkovine amfotericin B.



Slika 37: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine vankomicin (antibiotik) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO5) na različne koncentracije (2×MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protigliivične učinkovine flukonazol.

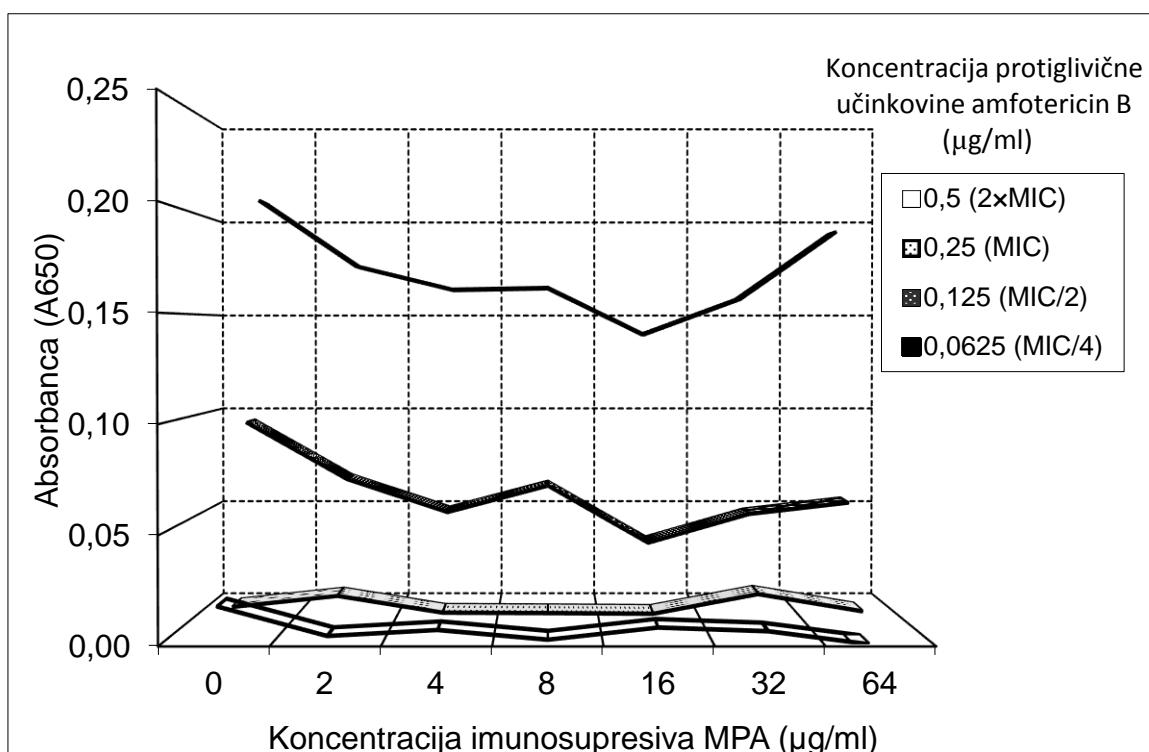


Slika 38: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine vankomicin (antibiotik) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO5) na različne koncentracije ( $2 \times \text{MIC}$ ,  $\text{MIC}$ ,  $\text{MIC}/2$  in  $\text{MIC}/4$ ) protigliivične učinkovine itraconazol.

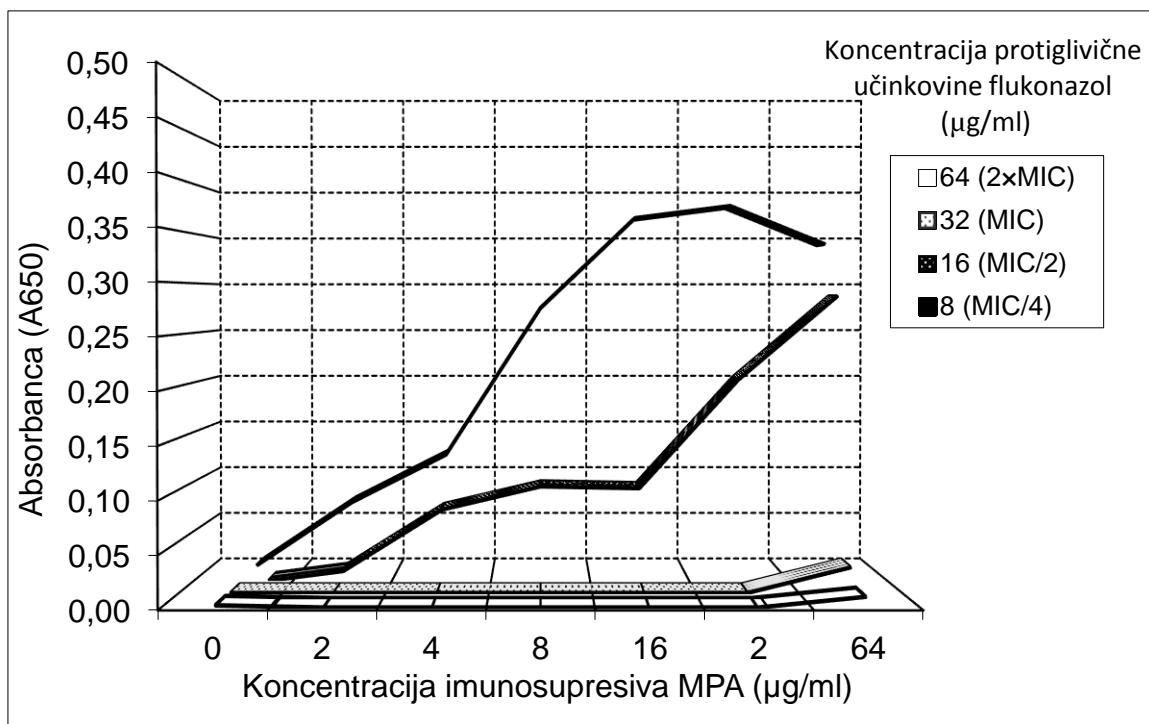
#### 4.5.2 Modulatorni učinki imunosupresiva MPA na rast *S. boulardii* ob dodatku protigliivičnih učinkovin amfotericin B, flukonazol in itraconazol.

Modulatorni učinek medicinske učinkovine MPA na testirane protigliivične učinkovine smo v skladu s protokolom pod točko 3.3.5 določili v primeru, ko je spremenjanje koncentracije medicinske učinkovine MPA vplivala sinergistično ali antagonistično na vrednost MIC testiranega seva pridobljenega s testom standarda CLSI. Rezultate (absorbance) modulatornih učinkov pridobljene z optičnim čitalcem smo na koncu predstavili na slikah 39-41.

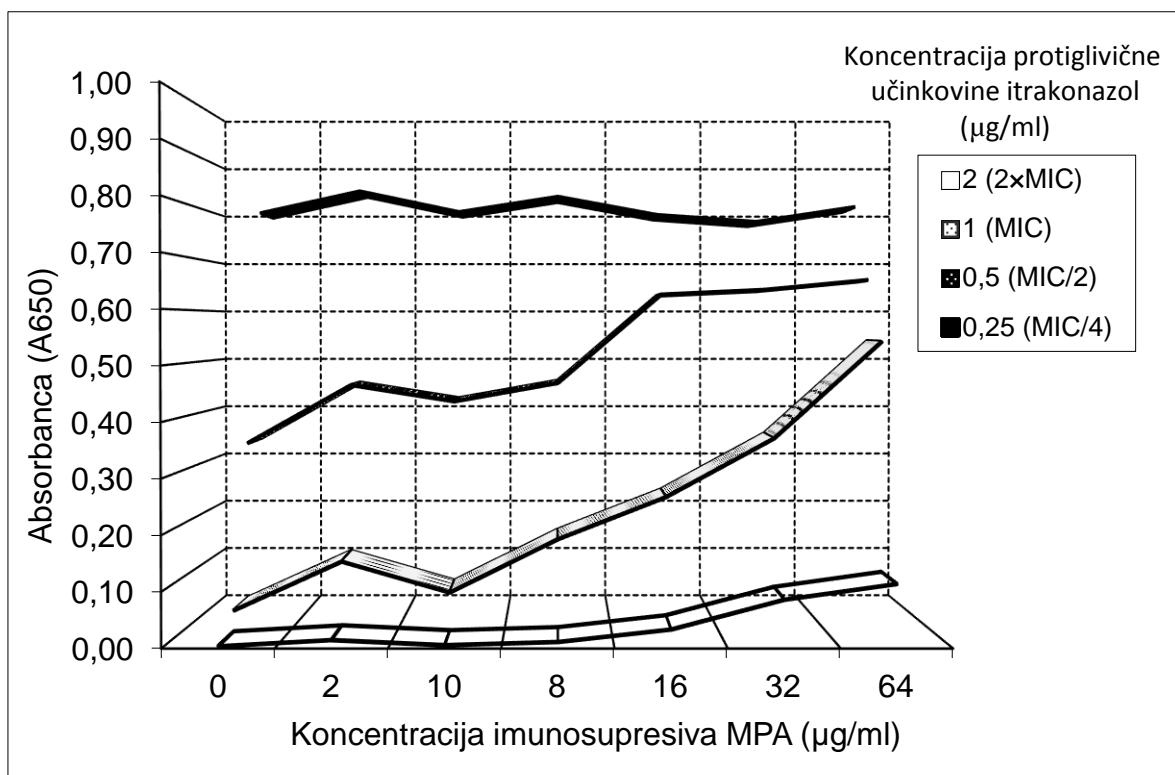
Rezultati na slikah 39-41 nam kažejo, da imunosupresiv MPA ne vpliva na delovanje protigliivične učinkovine amfotericin B (slika 39), medtem ko deluje antagonistično na protigliivični učinkovini flukonazol (slika 40) in itraconazol (slika 41). To se je na slikah flukonazola in itraconazola kazalo v povečani absorbanci (večji rasti celic) ob naraščanju koncentracije medicinske učinkovine MPA.



Slika 39: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine MPA (imunosupresiv) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO1) na različne koncentracije ( $2\times\text{MIC}$ , MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglične učinkovine amfotericin B.



Slika 40: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine MPA (imunosupresiv) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO1) na različne koncentracije ( $2\times\text{MIC}$ , MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglične učinkovine flukonazol.



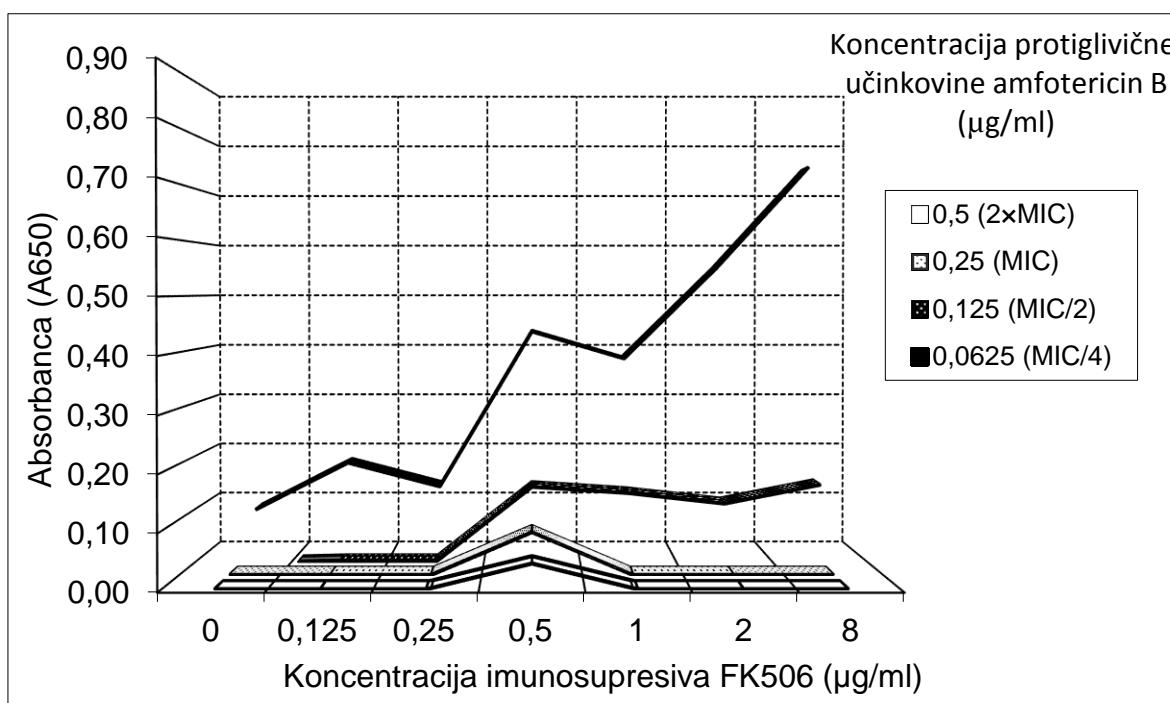
Slika 41: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine MPA (imunosupresiv) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO1) na različne koncentracije ( $2 \times \text{MIC}$ ,  $\text{MIC}$ ,  $\text{MIC}/2$  in  $\text{MIC}/4$ ) protigliivične učinkovine itraconazol.

#### 4.5.3 Modulatorni učinkvi imunosupresiva FK 506 na rast *S. boulardii* ob dodatku protigliivičnih učinkovin amfotericin B, flukonazol in itraconazol.

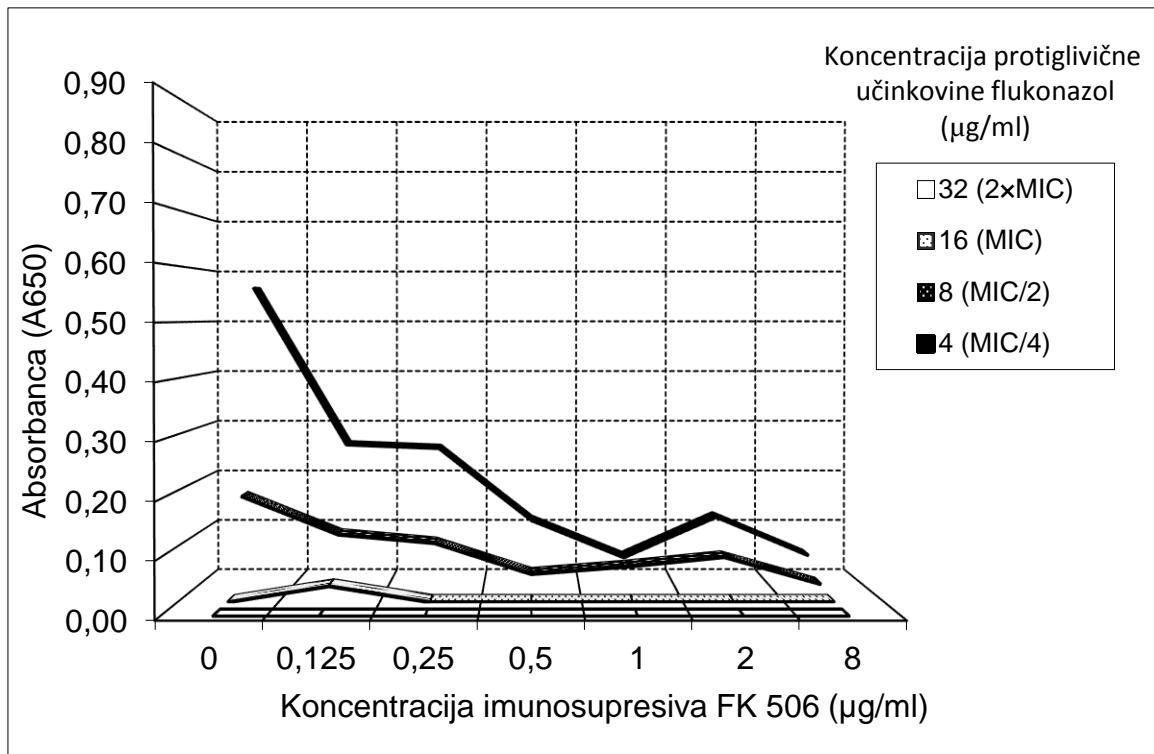
Modulatorne učinke medicinske učinkovine FK506 na testirane protigliivične učinkovine smo podobno kot pri točki 5.5.2 določili v primeru, ko je spremenjanje koncentracije medicinske učinkovine FK506 vplivala sinergistično ali antagonistično na vrednost MIC testiranega seva pridobljenega s testom standarda CLSI.

Pridobljene rezultate absorbanc smo na koncu predstavili na slikah 42-44.

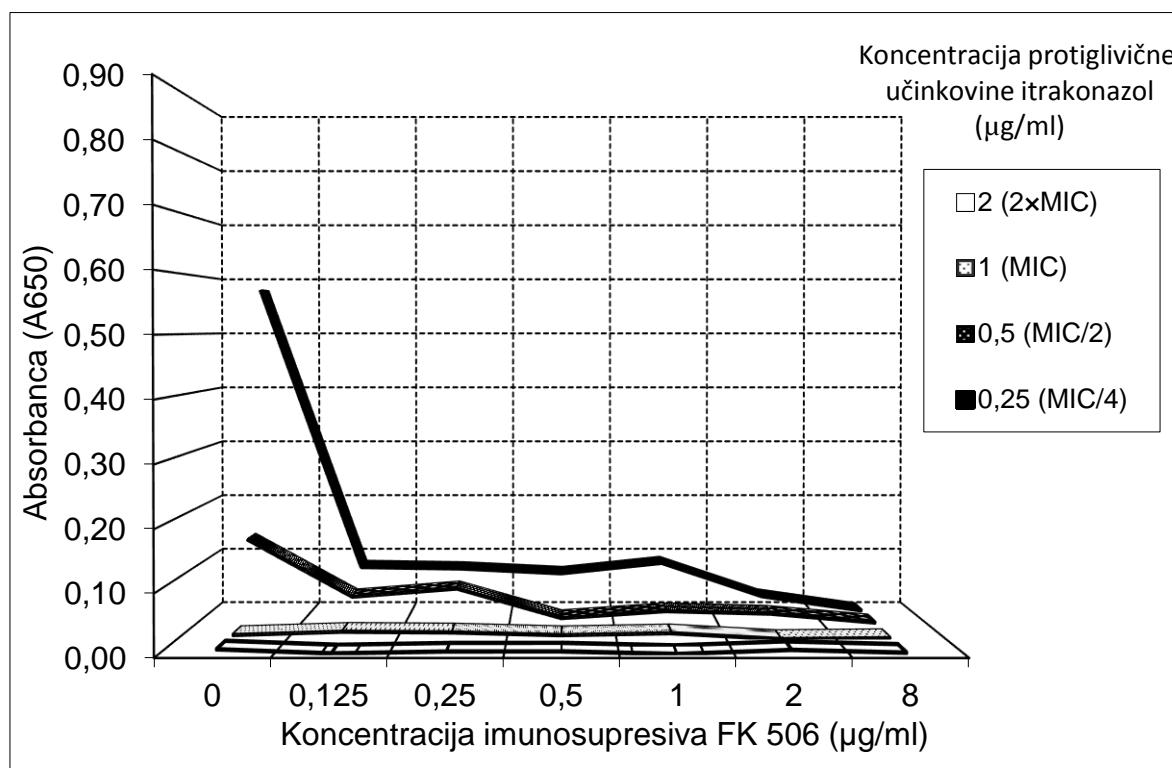
Imunosupresiv FK506 je glede na rezultate z naraščanjem koncentracije antagonistično deloval na amfotericina B. Na sliki 42 se to kaže z dvigom krivulj  $\text{MIC}/4$  in  $\text{MIC}/2$  pri višjih koncentracijah medicinske učinkovine FK506. V nasprotju z amfotericinom B, je imunosupresiv deloval sinergistično na protigliivični učinkovini flukonazol in itraconazol, ki izhajata iz azolnih protigliivičnih skupih. Sinergistični učinek se je na slikah 43 in 44 kazal v padcu absorbance pri vseh krivuljih z naraščanjem koncentracije imunosupresiva. To pomeni, da je imunosupresiv FK506 skupaj s protigliivičnima učinkovinoma itraconazol in flukonazol bolje zaviral rast probiotične kvasovke *S. boulardii* kot pa protigliivični učinkovini sami in je bil zato učinek večji.



Slika 42: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine FK506 (imunosupresiv) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO1) na različne koncentracije ( $2\times\text{MIC}$ ,  $\text{MIC}$ ,  $\text{MIC}/2$  in  $\text{MIC}/4$ ) protigliivične učinkovine amfotericin B.



Slika 43: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine FK506 (imunosupresiv) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO1) na različne koncentracije ( $2\times\text{MIC}$ ,  $\text{MIC}$ ,  $\text{MIC}/2$  in  $\text{MIC}/4$ ) protigliivične učinkovine flukonazol.



Slika 44: Določanje modulatornih učinkov medicinske učinkovine FK506 (imunosupresiv) na občutljivost sevov *S. boulardii* (PRO1) na različne koncentracije ( $2\times$ MIC, MIC, MIC/2 in MIC/4) protiglivične učinkovine itrakonazol.

## 5 RAZPRAVA

V magistrski nalogi smo preverjali odpornost na protiglivične učinkovine in invazivnost komercialnih probiotičnih kvasovk *S. boulardii*. Za osnovo smo opredelili delovne hipoteze, s pomočjo katerih smo ugotavljali varnostni aspekt probiotika *S. boulardii*. Poleg varnostnega aspekta smo preverili tudi preživetvene sposobnosti probiotika *S. boulardii*, kot tudi modulatorne učinke medicinskih učinkovin na delovanje protiglivičnih učinkovin na testirane probiotične seve.

### 5.1 PREŽIVETVENE SPOSOBNOSTI PROBIOTIKA *S. boulardii* (pH, T, koncentracija)

Preživetvene sposobnosti probiotika *S. boulardii* predstavljajo pomemben element pri določanju učinkovitosti probiotika. S pomočjo preživetja pri različnih pH vrednostih, temperaturah in pri različnih koncentracijah lahko določimo ali bo število probiotikov, ki bodo dosegli tarčno mesto v črevesju ustrezno za pozitivne učinke.

#### 5.1.1 Komercialni probiotik *S. boulardii*

Evropska in Slovenska zakonodaja s pomočjo deklaracije omogočata navedbo podatkov na embalažah, ki potrošniku omogočajo vpogled v sestavo izdelka, njegovo poreklo, varnost in ustreznost. Samo označevanje izdelkov določujejo uredbe, pravilniki, zakoni, akti in priporočila določena s strani EU, ki se jih morajo proizvajalci držati (Uredba (EU)..., 2011; Pravilnik..., 2014; Uredba..., 2014). V primeru kršenja teh zakonov, lahko EU od proizvajalca zahteva odpoklic izdelkov in prepoved prodaje, čemur sledijo tudi denarne kazni.

S pomočjo štetja celic v kapsulah komercialnih probiotikov *S. boulardii* smo žeeli preveriti ustreznost števila celic s številom celic predpisanih na embalaži probiotičnih pripravkov. Število celic smo določevali z dvema metodama in sicer z metodo CFU na kapsulo in metodo "ImageJ". Rezultati pod točko 4.1.1 kažejo na to, da se rezultati raziskav 3 od 5 testiranih probiotičnih pripravkov ujemajo z deklaracijo. V 2 primerih (probiotika PRO2 in PRO4) smo ugotovili odstopanje od števila celic predpisanih na embalaži komercialnih probiotičnih pripravkov. To bi lahko predpisali nepravilni deklaraciji, večji vsebnosti drugih snovi v kapsuli ter morebitnim napakam pri merjenju. Razlog, za neustreznost embalaž, bi se lahko skrival tudi v slabši zakonodaji EU na področju prehranskih dopolnil, ki težko nadzira vse izdelke na trgu (Silverglade in Heller, 2010). Kazni v primeru neskladnosti so časovno zamudne in zato velikokrat izdelki z nepravilno deklaracijo ostanejo dalj časa na trgu (Commission on Dietary..., 1997).

Poleg števila celic v kapsulah komercialnih probiotičnih pripravkov *S. boulardii* smo za primerjavo števila celic določili tudi v 250 mg navadnem pekovskem kvasu. Z določevanjem števila celic v 250 mg pekovskem kvasu PEK1 smo ugotovili, da je število celic primerljivo s številom celic v komercialnih probiotičnih pripravkih *S. boulardii* (poglavlje 4.1.1). Kljub primerljivemu številu celic pa so imeli komercialni probiotični pripravki *S. boulardii* glede na rezultate boljšo stopnjo preživetja skozi prebavni trakt (hitrejša rast, večja odpornost na temperaturni in kislinski stres) kot testirana pekovska kvasovka *S. cerevisiae*, kar je pomembna karakteristika za uporabo mikroorganizma kot probiotika (Fietto in sod., 2004; Edwards-Ingram in sod., 2007). V tem magistrskem delu (poglavlje 4.4) smo razlike med

pekovskim kvasom in probiotiki opazili tudi pri občutljivosti na amfotericin B, itrakonazol in flukonazol.

### 5.1.2 Primerjava metod "ImageJ" in metode CFU

Število celic smo določevali z metodama CFU in metodo "ImageJ". Primerjava obeh metod je pokazala, da je metoda "ImageJ" bolj natančna v primerjavi z metodo CFU. Razlog za to se skriva v manjši indirektnosti metode "ImageJ" v primerjavi z metodo CFU ter zmanjšanju vpliva človeškega faktorja (pipetiranje, odčitava kolonij, spremenljivost pogojev) oz. avtomatizaciji (Zupan in sod., 2013a). Metoda CFU zahteva redčitve in nacepljanje, poleg tega pa morajo celice na gojišču zrasti, kar lahko povzroči dodatne težave, saj so lahko celice zlepiljene in zrastejo v eno kolonijo ali pa ne zrastejo in so še vedno na gojišču viabilne vendar ne kultivabilne (Bloomfield in sod., 1998). Če primerjamo standardno deviacijo obeh metod (poglavlje 4.1) lahko hitro opazimo, da je povprečna standardna deviacija pri metodi CFU 12 % v primerjavi z metodo "ImageJ", kjer je bila povprečna standardna deviacija 2,3 %. Metoda "ImageJ" je omogočila tudi hitrejšo analizo, saj v primerjavi z metodo CFU ni bilo treba čakati celic, da so zrastle. Kljub temu je pomanjkljivost metode "ImageJ" uporaba le te v bistrih gojiščih. V primerjavi z metodo CFU pri metodi "ImageJ" ne moremo šteti celic v gojišču, ki ima delce, saj bi lahko le te zamenjali za celice.

### 5.1.3 Vpliv temperature in pH na živost *S. boulardii*

Na poti do tarčnega mesta (tanko črevo) mora biti probiotična kvasovka sposobna preživeti v okolju z različnim pH, pri tem pa ne smemo pozabiti na sposobnost rasti pri normalni (37 °C) in povišani (39 °C) telesni temperaturi (Czerucka in sod., 2007).

Glede na rezultate pod točko 4.3.1 je povišana temperatura (39 °C) vplivala na občutno zmanjšanje rasti probiotičnih sevov, kar se je odražalo v nižjih celokupnih volumnih kolonij na površini trdnega gojišča vseh 5 komercialnih probiotičnih sevov (PRO1, PRO4, PRO3, PRO2, PRO5). Rast se je pri vseh testiranih sevih zmanjšala za več kot polovico. Rezultati sovpadajo tudi z dejstvom, da so v večini primerov le patogeni sevi sposobni dobro rasti pri povišani telesni temperaturi (39 °C) (Llopis in sod., 2014). Kljub manjši rasti pri 39 °C, lahko zaradi dobre sposobnosti rasti pri 37 °C sklepamo, da so s stališča temperature vsi testirani komercialni probiotični sevi sposobni rasti v prebavilih človeka.

Glede na rezultate pod točko 4.2 lahko sklepamo, da so po treh urah testirani probiotični sevi slabše rastli v kislem pH (slike 18, 20 in 22), medtem ko so v bazičnem pH-ju (slika 24) rastli nekoliko boljše. Kljub temu so testirani probiotični sevi preživeli rast pri različnih pH vrednostih v časovnih intervalih značilnih za prebavila, kar je skladno z našo hipotezo o dosegi tarčnega mesta v tankem črevesju. Število celic v kapsulah komercialnih probiotikov, ki bi s stališča pH in temperature doseglja tarčno mesto v tankem črevesju, je glede na rezultate pod točko 4.2 in ob upoštevanju povprečnega časa praznjenja želodca in tankega črevesja zadostno. Kot lahko vidimo na sliki 26, je bilo število celic v kapsulah komercialnih probiotikov, ki bi dosegle tarčno mesto pri vseh testiranih probiotikih višje od  $6 \times 10^6$  CFU/ml, kar sovpada z minimalno koncentracijo probiotikov potrebnih za pozitivno učinkovanje, ki se giblje med  $10^6$  CFU/ml in  $10^8$  CFU/ml (Kechagia in sod., 2013). Prav tako se število celic testiranih sevov tekom opisanega tretmaja s pH ni spremenjalo in je ohranilo približno enako vrednost. Izjema je bil sev PRO5, kjer se je število celic na poti do tarčnega mesta občutno povečalo in doseglje vrednost  $6 \times 10^7$  CFU/ml. Na podlagi opažanja

lahko sklepamo, da vsi testirani probiotični sevi *S. boulardii* niso bili enaki, kljub temu, da naj bi izhajali iz istega probiotičnega seva in da je probiotični sev PRO5 kazal izjemno preživetveno sposobnost pri prehodu skozi prebavni sistem do tarčnega mesta.

#### **5.1.4 Primerjava živosti *S. boulardii* s patogenim sevom *Candida glabrata***

*C. glabrata* je patogeni sev, za katere je v splošnem značilna dobra rast pri povišani telesni temperaturi ter različnih pH vrednostih (Odds, 1993; Ullah in sod., 2013). V skladu s pričakovanji tudi naši rezultati kažejo na to, da je *C. glabrata* bolje rastla pri vseh testiranih pH vrednostih, kot tudi pri povišani temperaturi v primerjavi s testiranimi probiotičnimi sevi. Preživelost skozi prebavni trakt oz. na poti do tarčnega mesta se je tako za *C. glabrata* še povečala. To lahko razložimo z visoko patogenostjo testiranega seva ter dobro razvitim obrambnim mehanizmom seva namenjenemu preživetju v težjih pogojih (Fidel in sod., 1999).

Glede na ciljno mesto delovanja patogenega in probiotičnega seva bi pričakovali, da bosta imela oba seva približno enake sposobnosti preživetja skozi prebavni trakt, vendar rezultati kažejo drugače. Razliko bi lahko pripisali tako razlikami med vrstam kvasovk, boljšemu obrambnemu mehanizmu in boljši prilagodljivosti patogene *C. glabrata* (Fidel in sod., 1999).

#### **5.2 VARNOSTNI ASPEKT PROBIOTIKA *S. boulardii***

Določitev varnostnega aspekta probiotika *S. boulardii*, je bila nujna zaradi poročil o okužbah s probiotično kvasovko *S. boulardii* pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom (Cassone in sod., 2003; Graf in Gavazzi, 2007; Thygesen in sod., 2012; Costa-Liboredo in sod., 2014). Varnostni aspekt *S. boulardii* predstavlja tako glavni namen tega magistrskega dela, saj je probiotična kvasovka *S. boulardii* oz. *S. cerevisiae* trenutno smatrana kot varna za uporabo (Nevoigt, 2008). Samo varnostni aspekt probiotika smo določili glede na njegovo invazivnost, sposobnost preživetja pri višji temperaturi (37 in 39 °C) in protiglivično odpornost v primeru okužbe.

##### **5.2.1 Invazivnost probiotika *S. boulardii***

Za določanje varnosti komercialnih probiotikov *S. boulardii* smo se najprej osredotočili na invazivnost testiranih sevov, saj le ta predstavlja enega izmed potencialnih faktorjev za določanje patogenosti sevov (Madigan in sod., 2012). Rezultati invazivnosti pri 37 °C in 39 °C v agar (poglavlje 4.3) so bili v skladu s pričakovanji in niso pokazali invazivnost testiranih probiotičnih sevov *S. boulardii* (PRO1, PRO5, PRO4; PRO3, PRO2) v primerjavi s patogenimi sevi *C. glabrata* in *C. krusei*.

Odsotnost invazivnosti je bila opazna tudi ob dodatku različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin v agar v primerjavi s patogenimi sevi. Invazivnost testiranih sevov kljub temu ne moremo popolnoma izključiti, saj eksperimentalni pogoji popolnoma ne odražajo pogojev *in vivo*. Zanimivi bodo tudi rezultati testov invazije, ki so bili izvedeni izven okvira te magisterske naloge, pri katerih so bili v gojišča poleg protiglivičnih učinkovin dodani tudi imunosupresivi. Na drugi strani obstaja možnost, da je pri v delu omenjenih okužbah šlo za okužbo s patogeno *S. cerevisiae*, ki so jo zaradi podobnosti zamenjali s *S. boulardii*. Zanimiva je tudi slabša površinska rast pri 39 °C, saj imajo ljudje z oslabljenim imunskim sistemom zaradi sistemskih težav velikokrat povišano telesno temperaturo (Patel in Riedel,

2013), kar bi pomenilo da imajo ljudje s povišano temperaturo manj ustrezeno okolje za rast *S. boulardii*. Zelo verjetna je tudi opcija, da je *S. boulardii* vstopil v krvni obtok preko intravenskega katetra. V literaturi lahko najdemo kar nekaj poročil o okužbah s *S. cerevisiae* preko intravenskega katetra (Hennequin in sod., 2000; Robin, 2010).

Kljub zgoraj navedenemu smo pri ločenemu eksperimentu opazili delno invazivnost probiotika PRO2. S stališča eksperimentiranja smo vse testirane seve inkubirali 14 dni na gojišču SAB pri 24 °C. V tem času je sevom začelo zmanjkovati hrane in osnovnih elementov (glukoza, dušik) v gojišču. Po podrobнем opazovanju gojišča smo lahko opazili, da je bil komercialni probiotik PRO2 delno invaziven. To bi lahko pripisali prilagoditvi sevov na pomanjkanje hranil ter bipolarni rasti, ki se odraža v usmerjeni rasti v podlagu. Pri bipolarni rasti lahko celice s pomočjo sile prodirajo v agar (Roberts in Fink, 1994).

### **5.2.2 Primerjava invazivnosti *S. boulardii* s patogenim sevom *C. glabrata***

Primerjava invazivnosti med *S. boulardii* in *C. glabrata* je pomembna saj gre v tem primeru za izredno sorodni vrsti (Roetzer in sod., 2011). Rezultati pod točko 4.3 kažejo na to, da je patogena *C. glabrata* rastla invazivno tako pri 37 °C kot tudi pri 39 °C v primerjavi s *S. boulardii*. Invazivnost se je pri *C. glabrata* kazala tudi ob dodatku različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin v agar v primerjavi s probiotikom. *S. boulardii*. Četudi komercialni probiotični sevi *S. boulardii* v našem eksperimentu niso rastli invazivno, pa je pomembno povedati, da v večini primerov dobro prenašajo površinsko rast v visokih koncentracijah protiglivičnih učinkovin v primerjavi s patogeno *C. glabrata*. Na podlagi ugotovljenega je pomembno povedati, da če v primeru probiotične terapije slučajno pride do sistemске okužbe s probiotičnimi kvasovkami, protiglivična zdravila niso nujno učinkovita.

### **5.2.3 Odpornost *S. boulardii* na protiglivične učinkovine**

Določanje odpornosti testiranih probiotičnih sevov na protiglivične učinkovine je pomembno pri okužbah, če v primeru probiotične terapije pride do sistemске okužbe z probiotičnimi kvasovkami (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Glede na rezultate pod točko 4.4 lahko povemo, da nobeden od komercialnih probiotičnih sevov *S. boulardii* ni bil odporen na testirane protiglivične učinkovine (amfotericin B, itrakonazol, flukonazol in kaspofungin). Delno odpornost smo lahko opazili le pri protiglivični učinkovini itrakonazol, vendar tudi tu ni noben od probiotičnih sevov presegel meje odpornosti (CLSI, 2008; CLSI, 2010), s čimer lahko glede na rezultate potrdimo, da so protiglivična zdravila v primeru sistemске okužbe s probiotiki učinkovita.

### **5.2.4 Primerjava odpornosti *S. boulardii* s sevi *C. glabrata* in *C. krusei***

Patogena seva *C. glabrata* in *C. krusei*, ki sta sorodstveno podobna probiotičnim kvasovkam *S. boulardii* (Roetzer in sod., 2011), sta kazala glede na rezultate pod točko 4.4 večjo odpornost na protiglivično učinkovino amfotericin B v primerjavi s komercialnimi probiotičnimi sevi. To bi lahko predpisali virulentnim genom, ki jih imata kvasovki ter boljšim stresnim mehanizmom v primerjavi s probiotičnimi kvasovkami (Brown in sod., 2014). Večjo odpornost bi lahko razložili tudi z dejstvom, da v medicini že leta zdravijo kandidoze z različnimi protiglivičnimi učinkovinami (Labbe in sod., 2009). Zato so te vrste

skozi leta razvile boljšo odpornost na protiglivično učinkovino amfotericin B v primerjavi s probiotičnimi kvasovkami, ki veljajo za varne (Nevoigt, 2008).

### 5.2.5 Potencialna nevarnost komercialnega pekovskega kvasa PEK1

V nasprotju s pričakovanji smo glede na rezultate pod točko 4.3 in 4.4 opazili delno invazivnost ter odpornost komercialnega pekovskega kvasa PEK1 na protiglivično učinkovino itrakonazol, kar bi pomenilo, da protiglivična učinkovina itrakonazol v primeru sistemskih okužb s pekovsko kvasovk ni najbolj učinkovita. Splošno je znano, da predvsem starejši ljudje občasno zaužijejo kvas z namenom izboljšati zdravje. Prav, tako se pekovska kvasovka uporablja dnevno pri pripravi različnih živil. Glede na GRAS status testirane pekovske kvasovke, bi bilo z obzirom na delno invazivnost, potrebno glede na rezultate opraviti še nadaljnje raziskave o potencialni nevarnosti pekovskega kvasa (Nevoigt, 2008). Obstaja celo možnost, da je za poročila o okužbah s *S. boulardii* odgovorna prav kvasovka *S. cerevisiae* (Graf in Gavazzi, 2007). V praksi občasno pride do sistemskih okužb s sicer nepatogenimi v okolju in hrani navzočimi mikroorganizmi, pri čemer je verjetnost okužbe s probiotičnimi in pekovskimi kvasovkami enaka kot s povsod prisotnimi nepatogenimi mikroorganizmi. Kljub temu moramo upoštevati, da večina živil, ki vključuje uporabo pekovskega kvasa sledi termični obdelavi produkta (Pausch in sod., 2005), kar bi bilo lahko povezano z delnim uničenjem kvasnega seva.

### 5.2.6 Primerjava MIC na trdnih in tekočih gojiščih

Rezultati pod točko 4.4.7 kažejo na to, da je MICING vrednost izmerjena s testom invazivne rasti v agar višja kot vrednost MIC določena s testom standarda CLSI. Razlog za to bi se lahko skrival v manjši izpostavljenosti kvasovk protiglivičnim učinkovinam na trdnem gojišču (test invazivnosti), v primerjavi s tekočim gojiščem (CLSI test). Na trdnem gojišču so namreč kvasovke izpostavljene protiglivičnim učinkovinam le na stiku gojišče-kvasovka, medtem ko jih v tekočem gojišču protiglivična učinkovina obdaja z vseh strani in ima zato na voljo večjo površino kvasovk za njeno delovanje. Prav tako se lahko razlog skriva v večji disperziji in/ali topnosti protiglivičnih učinkovin v tekočem gojišču v primerjavi s trdnim gojiščem, zato bi bilo potrebno v nadalnjih raziskavah poskrbeti za še boljšo homogenost trdnega gojišča v kombinaciji s protiglivično učinkovino, da bi lahko optimizirali ta parameter.

### 5.2.7 Slaba rast *S. boulardii* na gojišču RPMI

Tekom poskusa, smo z večjim številom ponovitev raziskav ugotovili, da probiotična kvasovka *S. boulardii* ni zmožna rasti na standardnem gojišču RPMI v predvidenem času CLSI testa. Kljub številnim poskusom samega vzroka nismo uspeli najti. Razlog za to, bi se lahko skrival v slabši nutrientski sestavi (manjši vsebnosti dušika in glukoze) kemijsko definiranega medija RPMI (Sigma-Aldrich, 2015a) v primerjavi z bogato nutrientsko sestavo nedefiniranega gojišča SAB (Sigma-Aldrich, 2015b), kar bi lahko vplivalo na boljšo rast probiotične kvasovke *S. boulardii* v gojišču SAB in slabšo v mediju RPMI (Meletiadis in sod., 2001). Nezmožnosti rasti probiotičnih kvasovk na gojišču RPMI v primerjavi z ostalimi testiranimi kvasovkami (*S. cerevisiae*, *C. glabrata*...), bi lahko pomenil tudi hiter test za razlikovanje med *S. boulardii* in *S. cerevisiae* ter s tem tudi delno potrditev probiotične kvasovke *S. boulardii* kot svoje vrste.

## 5.3 MODULATORNI UČINKI

### 5.3.1 Modulatorni učinki medicinskih učinkov na občutljivost *S. boulardii* na protiglivične učinkovine

S testiranjem modulatornih učinkov medicinskih učinkov na občutljivost probiotičnih sevov na protiglivične učinkovine, smo žeeli ugotoviti ali lahko testirane medicinske učinkovine vplivajo na večjo ali manjšo dovzetnost probiotičnih sevov na protiglivične učinkovine. V medicini se namreč pogosto poslužujejo zdravljenja z več različnimi terapijami hkrati, kot je na primer zdravljenje z imunosupresivi (npr. pri presaditvi organov) ter sočasnim uživanjem probiotikov za izboljšanje črevesne mikrobiote oz. imunskega sistema (Floch in sod., 2011; Kelesidis in Pothoulakis, 2011; Costa-Liboredo in sod., 2014). Antagonistični učinki medinskih učinkov so lahko v takih primerih odgovorni za slabše zdravljenje glivnih okužb, medtem ko bi s sinergističnimi učinki lahko dosegli enak učinek z manjšimi koncentracijami protiglivičnih učinkovin.

#### Antagonistični učinki:

Na podlagi rezultatov pod točko 4.5 lahko sklepamo, da imunosupresiv MPA skupaj z itrakonazolom ali flukonazolom antagonistično vpliva na občutljivost sevov *S. boulardii* na testirani protiglivični učinkovini. V praksi to pomeni, da bi v primeru terapije z imunosupresivom MPA potrebovali večjo koncentracijo protiglivičnih učinkovin flukonazol in itrakonazol, da bi zajezili glivno okužbo s *S. boulardii*, če bi veljali predstavljeni *in vitro* rezultati tudi v *in vivo* okolju.

Prav tako rezultati kažejo, da v *in vitro* pogojih predstavlja nevarnost tudi uporaba imunosupresiva FK506 skupaj s protiglivično učinkovino amfotericin B, saj antognostični učinek teži k uporabi večje koncentracije že tako zelo strupene protiglivične učinkovine amfotericin B.

Razlog za antagonistične učinke bi se lahko v prvi vrsti skrival v povečanemu delovanju izlivnih črpalk kot odzivu na stres (prisotnost imunosupresiva), pri čemer bi izlivne črpalke povečale črpanje protiglivične učinkovine iz celice. Prav tako, bi se lahko omenjena imunosupresiva (MPA in FK506) vezala na omenjene protiglivične učinkovine (itrakonazol, flukonazol in amfotericin B), ter posledično vplivala na manjši prehod protiglivične učinkovine v celico probiotične kvasovke *S. boulardii*. Možno bi bilo tudi, da omenjene medicinske učinkovine spremenijo sestavo protiglivične učinkovine ter tako zmanjšajo njihov efekt v kvasovkah ali pa omogočijo lažjo razgradnjo protiglivičnih učinkovin v celicah. Razlog bi lahko iskali tudi v tem, da imunosupresiv (npr. FK506, MPA) prepreči vezavo protiglivične učinkovine na tarčno mesto (Kwan in sod., 1972; Brizuela in sod., 1991). Zaradi ugotovljenega bi morali posebej paziti pri doziranju protiglivičnih učinkovin pacientom, ki so deležnih takih terapij za zdravljenje glivnih okužb.

#### Sinergistični učinki:

Kljub nekaterim ugotovljenim antagonističnim učinkom nam rezultati pod točko 4.5 kažejo tudi na nekatere pozitivne sinergistične učinke.

Imunosupresiv FK506 je skupaj s flukonazolom ali itrakonazolom vplival sinergistično na občutljivost probiotičnih sevov na omenjeni protiglivični učinkovini. Ugotovitev bi lahko

pomenila napredek pri zdravljenju glivnih okužb, saj bi z manjšo količino flukonazola ali itrakonazola od prisotnosti imunosupresiva FK506 dosegli enak učinek na probiotične kvasovke v primeru okužb. Sama ugotovitev bi tako lahko potencialno prinesla napredek tako na zdravstvenem nivoju kot tudi na ekonomskem, zaradi uporabe manjših koncentracij omenjenih protiglivičnih učinkovin. FK506 bi tako lahko skupaj s flukonazolom ali itrakonazolom izboljšal učinek zdravljenja okužb s *S. boulardii* (Brizuela in sod., 1991).

### **5.3.2 Potencialna uporaba protiglivične učinkovine kaspofungin skupaj z gojiščem SAB**

Izven zastavljenih raziskav smo po naključju opisanim v točki 4.4.6 prišli do ugotovitve, ki bi lahko bila povezana s povečanjem učinkovitosti protiglivične učinkovine kaspofungin. Pri uporabi protiglivične učinkovine kaspofungin skupaj z gojiščem SAB, smo dosegli izjemen sinergistični učinek na občutljivost testiranih patogenih sevov. Protiglivična učinkovina kaspofungin je bila do 16x bolj učinkovita na gojišču SAB, kot na gojišču RPMI.

Razlog za povečano učinkovitost kaspofungina v kombinaciji z gojiščem SAB, bi bila lahko različna stopnja rasti testiranih sevov na gojišču SAB in mediju RPMI. Dokazano, so kvasovke v eksponentni fazi rasti bolj občutljive na določene protiglivične učinkovine (npr. flukonazol), kot tiste v lag fazi rasti (Gale in sod., 1975; Van Den Bossche in sod., 1975).

Ker na trgu 50 mg viala kaspofungina stane okoli 400 €, menimo da imajo rezultati izjemen potencial za nadaljnje raziskave.

## 6 SKLEPI

Na podlagi rezultatov magisterskega dela lahko podamo naslednje sklepe:

- Komercialni probiotični sevi *S. boulardii* niso invazivni v agar, kar je skladno z našo hipotezo. Invazivnost je bila odsotna tako pri 37 °C in 39 °C kot tudi ob dodatku različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin v agar. Zaradi dejstva, da eksperimentalni pogoji popolnoma ne odražajo pogojev *in vivo* pa invazivnosti ne moremo popolnoma izključiti.
- Delno smo potrdili hipotezo, da bodo komercialni probiotični sevi imeli nizko odpornost na protiglivične učinkovine. Kljub temu, da nobeden od komercialnih probiotičnih sevov ni pokazal odpornosti na testirane protiglivične učinkovine (amfotericin B, fluconazol, itrakonazol in kaspofungin), sta dva probiotična seva dosegla mejno vrednost nad katero se določi odpornosti na protiglivično učinkovino itrakonazol.
- Delno smo ovrgli hipotezo, da probiotične kvasovke *S. boulardii* bolje rastejo v kislem kot v bazičnem pH. Po tri urnem testiranju so probiotični sevi slabše rastli v kislem pH in nekoliko boljše v bazičnem. Medtem ko so po 24 – urnem testiranju nekoliko boljše rastle v kislem pH v primerjavi z bazičnim.
- Število celic v kapsulah komercialnih probiotikov, ki bi s stališča pH dosegle tarčno mesto v tankem črevesju v viabilnem stanju, je ob upoštevanju časa praznjenja želodca in tankega črevesja zadostno. Kljub temu pa bi za bolj verodostojne rezultate bilo potrebno uporabiti kompleksnejše modele črevesja in analize.
- Pokazali smo, da lahko imunosupresiv MPA antagonistično učinkuje na delovanje itrakonazola in flukonazola, medtem ko ima imunosupresiv FK 506 lahko sinergistični učinek na flukonazol in itrakonazol.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

Uporaba probiotičnih kvasovk *S. boulardii* se zaradi njenih pozitivnih učinkov v svetu povečuje. Z večjo uporabo le teh, se povečujejo tudi poročila o glivnih okužbah pri imunsko oslabljenih pacientih po terapiji s *S. boulardii*. V magisteriju smo zato ugotavljali potencialno invazivnost in protiglivično odpornost probiotičnih kvasovk, kot tudi modulatorne učinke nekaterih medicinskih učinkovin na protiglivično odpornost ter preživelost kvasovk pri prehodu skozi prebavni sistem do tarčnega mesta v tankem črevesu. V prvem delu eksperimenta smo preverili ujemanje števila celic na deklaraciji komercialnih probiotičnih pripravkov *S. boulardii* s številom celic določenih z metodama CFU in metodo "ImageJ" ter preverili preživelost probiotičnih kvasovk pri prehodu skozi prebavni sistem do tarčnega mest. Ugotovili smo, da se je število celic na deklaraciji razen v dveh primerih ujemalo s številom celic določenih z omenjenima metodama. Na podlagi rezultatov živosti pri različnih vrednostih pH v intervalih značilnih za posamezni del prebavil, smo ugotovili, da število celic v kapsulah komercialnih probiotikov, ki bi glede na pH dosegle tarčno mesto v tankem črevesju zadostti minimalni koncentraciji probiotikov potrebnih za pozitivno učinkovanje. V drugem delu eksperimenta smo preverili invazivno rast kvasovke *S. boulardii* v agar pri normalni (37 °C) in povišani (39 °C) temperaturi ter ob dodatku različnih koncentracij protiglivičnih učinkovin (amfotericin B, itrakonazol, flukonazol, kaspofungin), saj invazivnost predstavlja enega od pomembnejših virulentnih faktorjev pri določevanju patogenosti seva. V skladu s hipotezo nobeden od komercialnih probiotičnih sevov *S. boulardii* ni pokazal invazivne rasti v agar. V tretjem delu smo zato preverili protiglivično odpornosti probiotičnih kvasovk na pogosto uporabljene protiglivične učinkovine (amfotericin B, flukonazol, itrakonazol in kaspofungin). Po modifikaciji testa protiglivične občutljivosti standarda CLSI (zamenjava medija RPMI z gojiščem SAB) zaradi nezmožnosti rasti probiotičnih sevov na gojišču RPMI smo ugotovili, da komercialni probiotični sevi večinoma niso odporni na omenjene protiglivične učinkovine. Nobeden od komercialnih probiotičnih kvasovk ni pokazal odpornosti na testirane protiglivične učinkovine, kljub temu pa je vredno omeniti, da sta dva probiotična seva (PRO4 in PRO5) doseгла mejno vrednost nad katero se lahko sev že opredeli kot odporen pri tretiranju s protiglivično učinkovino itrakonazol. V zadnjem četrtem delu eksperimenta, smo preverili modulatorne učinke nekaterih medicinskih učinkovin na občutljivost probiotičnih kvasovk na protiglivične učinkovine. V poročilih o glivnih okužbah po terapiji s probiotično *S. boulardii* smo zasledili, da je v večini primerov do glivnih okužb prišlo pri imunsko oslabljenih pacientih. Pri testiranju modulatornih učinkov smo zato uporabili dva imunosupresiva (FK506 in MPA) ter antibiotik vankomicin, ki se uporablja za zdravljenje okužb z bakterijo *Clostridium difficile*. Ugotovili smo, da antibiotik nima vpliva na delovanje protiglivičnih učinkovin, medtem ko imunosupresiv MPA ob prisotnosti itrakonazola ali flukonazola antagonistično vpliva na delovanje testiranih azolnih protiglivičnih učinkovin. V nasprotju z MPA pa smo ugotovili, da imunosupresiv FK506 ob prisotnosti flukonazola ali intakonazola vpliva sinergistično na delovanje testiranih azolnih protiglivičnih učinkovin. Z magistrskim delom smo ugotovili, da probiotične kvasovke niso invazivne v agar in niso odporne na testirane protiglivične učinkovine ter glede na rezultate ne predstavljajo nevarnosti. Previdnost pri terapiji s probiotiki pri imunskooslabljenih bolnikih je predvsem pomembna zaradi zmanjšane zmožnosti njihovega imunskega sistema preprečiti okužbo v kolikor do te pride. Ugotovljene modulatorne učinke pa je pomembno v tem primeru upoštevati.

## 7.2 SUMMARY

The use of the probiotic yeast *S. boulardii* is nowadays increasing in the world due to its special positive effects. Increased use of the yeast probiotic however is also connected with increased reports of fungal infections in immunocompromised patients after treatment with *S. boulardii*. Because of the reports we have decided to therefore evaluate the potential invasiveness and antifungal resistance of probiotic yeasts in this master thesis as well as assess modulatory effects of certain medical substances on antifungal resistance and assess yeast viability on its way through the digestive system to the target site located in the small intestine. In the first part of the experiment we compared the numbers of cells labeled on the declaration of commercial yeast probiotic preparations with the numbers of cells determined with CFU and "ImageJ" methods. Moreover we also verify the viability of the probiotic yeast on its way through the digestive system to the target site. We found out that the number of cells labeled on the declaration of commercial yeast probiotic except in two cases corresponded with the number of cells determined with methods mentioned above. Based on the results of survivability at different pH values in the intervals known for particular part of the gastrointestinal tract, we discovered that the number of cells in commercial probiotic yeasts would match the minimum concentration of probiotics necessary for a positive effect. In the second part of the experiment we observed invasive growth of yeast *S. boulardii* in agar at normal ( $37^{\circ}\text{C}$ ) and elevated ( $39^{\circ}\text{C}$ ) temperature, as well as invasive growth at the different concentrations of the antifungal agents (amphotericin B, fluconazole, itraconazole, caspofungin) since invasiveness represents one of the major virulence factors determining the pathogenicity of the strain. According to one of the hypothesis, none of the commercial probiotic strains *S. boulardii* showed invasive growth in agar. Therefore we observed antifungal resistance of the probiotics yeasts to commonly used antifungal agents (amphotericin B, fluconazole, itraconazole, caspofungin) in the third part. After modification of the antifungal susceptibility CLSI test (replacing the RPMI medium with SAB medium) due to the inability of probiotic yeasts to grow the RPMI medium, we found out that commercial probiotic yeasts show low sensitivity to the tested antifungal agents. None of the commercial yeast probiotics showed resistance to the tested antifungal agents, however two of the probiotic yeasts (POR4 and PRO 5) reached the threshold above which we can already define yeasts as resistant after treatment with the antifungal agent itraconazole. In the last fourth part of the experiment we checked modulatory effects of a certain medical agents on the sensitivity of the probiotic yeast to antifungal agents. The reports of the fungal infections after treatment with the probiotic *S. boulardii* had shown that in most cases fungal infection occurred in immunocompromised patients. In testing of modulatory effect we therefore used two immunosuppressive agents (FK506 and MPA) and antibiotic vancomycin, which is generally used for the treatment of *Clostridium difficile* infections. We found out that antibiotic does not affect the antifungal agents, while the immunosuppressant MPA works antagonistic on sensitivity of the probiotic yeast on antifungal agents itraconazole or fluconazole. In contrast immunosuppressant FK506 works synergistic on sensitivity of the probiotic yeast on antifungal agents itraconazole or fluconazole. In master thesis we found out that the probiotic yeast *S. boulardii* was not invasive in agar nor resistant to the tested antifungal agents and according to the results does not represent a danger. Caution while treating immunocompromised patients with probiotics is particularly important due to the reduced ability of their immune system to prevent infection if it occurs. In that case, modulatory effects should be taken into account.

## 7 VIRI

- Almirante B., Rodriguez D., Cuenca-Estrella M., Almela M., Sanchez F., Ayats J., Alonso-Tarres C., Rodriguez-Tudela J.L., Pahissa A. 2006. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 5: 1681-1685
- Amalaradjou M.A., Bhunia A.K. 2012. Modern approaches in probiotics research to control foodborne pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67: 185-239
- Anderson J.B., Sirjusingh C., Parsons A.B., Boone C., Wickens C., Cowen L.E., Kohn L.M. 2003. Mode of selection and experimental evolution of antifungal drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 163, 4: 1287-1298
- Andrews J.M., Brierley S.T., Blackshaw L.A. 2010. Small intestinal motor and sensory function and dysfunction. V: Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, management. 10<sup>th</sup> ed. Feldman M., Friedman L.S., Brandt L.J. (eds.). Philadelphia, Saunders/Elsevier: 1679-1695
- Angoulvant-Enache A., Hennequin C. 2005. Invasive *Saccharomyces* infection: a comprehensive review. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 11: 1559-1568
- Bassetti S., Frei R., Zimmerli W. 1998. Fungemia with *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with *Saccharomyces boulardii*. *American Journal of Medicine*, 105, 1: 71-72
- Ben-Ami R., Weinberger M., Orni-Wasserlauff R., Schwartz D., Itzhaki A., Lazarovitch T., Bash E., Aharoni Y., Moroz I., Giladi M. 2008. Time to blood culture positivity as a marker for catheter-related candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 7: 2222-2226
- Bicanic T.A., Harrison T.S. 2014. Systemic fungal infections. *Medicine*, 42, 1: 26-30
- Bloomfield S.F., Stewart G.S., Dodd C.E., Booth I.R., Power E.G. 1998. The viable but non-culturable phenomenon explained? *Microbiology*, 144, 1: 1-3
- Boyle R.J., Robins-Browne R.M., Tang M.L.K. 2006. Probiotic use in clinical practice what are the risks. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83, 6: 1256-1264
- Brass C., Stevens D.A. 1982. Maturity as a critical determinant of resistance to fungal infections studies in murine blastomycosis. *Infection and Immunity*, 36, 1: 387-395
- Bren A., Kandus A. 2006. Mesto mikofenolata v nefrologiji. *Medicinski razgledi*, 45, 3: 301-306
- Brizuela L., Chrebet G., Bostian K.A., Parent S.A. 1991. Antifungal properties of the immunosuppressant FK-506: identification of an FK-506-responsive yeast gene distinct from FKB1. *Molecular and Cellular Biology*, 11, 9: 4616-4626
- Brown A.J.P., Budge S., Kaloriti D., Tillmann A., Jacobsen M.D., Yin Z., Ene I.V., Bohovych I., Sandai D., Kastora S., Potrykus J., Ballou E.R., Childers D.S., Shahana S., Leach M.D. 2014. Stress adaptation in a pathogenic fungus. *Journal of Experimental Biology*, 217, 1: 144-155
- Buchacz K., Baker R.K., Palella F.J., Jr., Chmiel J.S., Lichtenstein K.A., Novak R.M., Wood K.C., Brooks J.T. 2010. AIDS-defining opportunistic illnesses in US patients, 1994-2007: a cohort study. *AIDS*, 24, 10: 1549-1559
- Bulpa P., Dive A., Sibille Y. 2007. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 30, 4: 782-800

- Butel M.J. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44, 1: 1-8
- Cannon J.P., Lee T.A., Bolanos J.T., Danziger L.H. 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24, 1: 31-40
- Cassone M., Serra P., Mondello F., Girolamo A., Scafetti S., Pistella E., Venditti M. 2003. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 11: 5340-5343
- CDC. 2014. Types of fungal diseases. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 1 str.  
<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/> (december 2014)
- Cesaro S., Chinello P., Rossi L., Zanesco L. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in a neutropenic patient treated with *Saccharomyces boulardii*. *Supportive Care in Cancer*, 8, 6: 504-505
- Chand D.V., Ghannoum M.A. 2012. Susceptibility testing of dermatophytes. IV: Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents : how to detect resistance. Hall G.S (ed.). New York, Humana Press: 89-96
- Chaya A.K., Pande S. 2007. Methods of specimen collection for diagnosis of superficial and subcutaneous fungal infections. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 73, 3: 202-205
- Chen J., Yang Q., Huang J., Li L. 2013. Risk factors for invasive pulmonary aspergillosis and hospital mortality in acute-on-chronic liver failure patients: a retrospective-cohort study. *International Journal of Medical Sciences*, 10, 12: 1625-1631
- CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard. 3<sup>rd</sup> ed. CLSI document M27-A3. Vol. 28, No. 14. Wayne, PA, CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute: 25 str.
- CLSI. 2010. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3. Vol. 28, No. 15. Wayne, PA, CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute: 21 str.
- Cohen S.H., Gerdin D.N., Johnson S., Kelly C.P., Loo V.G., McDonald L.C., Pepin J., Wilcox M.H., Society for Healthcare Epidemiology of America., Infectious Diseases Society of America. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31, 5: 431-455
- Costa-Liboredo J.C., Abreu Ferrari M.L., Garcia Vilela E., Soares Lima A., Toulson Davisson Correia M.I. 2014. The effect of *Saccharomyces boulardii* in patients eligible for liver transplantation. *Nutrición Hospitalaria*, 31, 2: 778-784
- Czerucka D., Piche T., Rampal P. 2007. Yeast as probiotics -- *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 6: 767-778
- Czerucka D., Rampal P. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes and Infection*, 4, 7: 733-739
- de Llanos R., Fernandez-Espinar M.T., Querol A. 2006a. A comparison of clinical and food *Saccharomyces cerevisiae* isolates on the basis of potential virulence factors. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90, 3: 221-231

- de Llanos R., Querol A., Peman J., Gobernado M., Fernandez-Espinar M.T. 2006b. Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. International Journal of Food Microbiology, 110, 3: 286-290
- de Moreno de Leblanc A., Matar C., Farnworth E., Perdigon G. 2007. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. Journal of Dairy Science, 90, 4: 1920-1928
- De Vuyst L., Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13, 4: 194-199
- Dickinson J.R., Kruckeberg A.L. 2004. Carbon metabolism. V: The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. 2<sup>nd</sup> ed. Dickinson J.R., Schweizer M. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 42-76
- Donowitz G.R., Maki D.G., Crnich C.J., Pappas P.G., Rolston K.V. 2001. Infections in the neutropenic patient--new views of an old problem. The Education Program of the American Society of Hematology, 2001, 1: 113-139
- Commission on Dietary Supplement Labels. 1997. Report of major issues and recommendations related to labeling of dietary supplements. Washington, Office of Disease Prevention and Health Promotion: 1 str.  
<http://health.gov/dietsupp/ch3.htm> (december 2014)
- Edwards-Ingram L., Gitsham P., Burton N., Warhurst G., Clarke I., Hoyle D., Oliver S.G., Stateva L. 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, 73, 8: 2458-2467
- Fidel P.L.J., Vazquez J.A., Sobel J.D. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clinical Microbiology Reviews, 12, 1: 80-96
- Fietto J.L., Araujo R.S., Valadao F.N., Fietto L.G., Brandao R.L., Neves M.J., Gomes F.C., Nicoli J.R., Castro I.M. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. Canadian Journal of Microbiology, 50, 8: 615-621
- Floch H., M., Walker A.W., Madsen K., Sanders M.E., Macfarlane G.T., Flint H.J., Dieleman L.A., Ringel Y., Guandalini S., Kelly C.P., Brandt L.J. 2011. Recommendations for probiotic use - 2011 update. Journal of Clinical Gastroenterology, 45, 1: 168-171
- Gale E.F., Johnson A.M., Kerridge D., Koh T.Y. 1975. Factors affecting the changes in amphotericin sensitivity of *Candida albicans* during growth. Journal of General Microbiology, 87, 1: 20-36
- Ghannoum M.A., Rice L.B. 1999. Antifungal agnets mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clinical Microbiology Reviews, 12, 4: 501-517
- Graf C., Gavazzi G. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an immunocompromised patient not treated with *Saccharomyces boulardii* preparation. Journal of Infection, 54, 3: 310-311
- Gronewold A.D., Wolpert R.L. 2008. Modeling the relationship between most probable number (MPN) and colony-forming unit (CFU) estimates of fecal coliform concentration. Water Research, 42, 13: 3327-3334

- Hardy J.G., Davis S.S., Khosla R., Robertson C.S. 1988. Gastrointestinal transit of small tablets in patients with ulcerative colitis. International Journal of Pharmaceutics, 48, 1–3: 79-82
- Hatoum R., Labrie S., Fliss I. 2012. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology, 19, 3: 421, doi: 10.3389/fmicb.2012.00421: 12 str.
- Hay R.J., Johns N.E., Williams H.C., Bolliger I.W., Dellavalle R.P., Margolis D.J., Marks R., Naldi L., Weinstock M.A., Wulf S.K., Michaud C., Murray J.L.C., Naghavi M. 2014. The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions. Journal of Investigative Dermatology, 134, 6: 1527-1534
- Hennequin C., Kauffmann-Lacroix C., Jobert A., Viard J.P., Ricour C., Jacquemin J.L., Berche P. 2000. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 19, 1: 16-20
- Hubbard G.B., Schmidt R.E., Eisenbrandt D.L., Witt W.M., Fletcher K.C. 1985. Fungal infections of ventriculi in captive birds. Journal of Wildlife Diseases, 21, 1: 25-28
- Hudournik N., Kristl J., Marinšek-Logar R., Teskač K. 2008. Pomen probiotikov kot prehranskih dopolnil in zdravil. Farmacevtski vestnik, 58, 6: 287-292
- ICZN. 2014. What is a nomen nudum. London, International Commission on Zoological Nomenclature: 1 str.  
<http://iczn.org/content/what-nomen-nudum> (december 2014)
- Im E., Pothoulakis C. 2010. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. Gastroentérologie Clinique et Biologique, 34, 1: 62-70
- Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. 2013. Health benefits of probiotics: a review. ISRN Nutrition: ID 481651, doi.org/10.5402/2013/481651: 7 str.
- Kelesidis T., Pothoulakis C. 2012. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. Therapeutic Advances in Gastroenterology, 5, 2: 111-125
- Khatri I., Akhtar A., Kaur K., Tomar R., Prasad G.S., Ramya T.N., Subramanian S. 2013. Gleaning evolutionary insights from the genome sequence of a probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. Gut Pathogens, 5, 1: 30, doi: 10.1186/1757-4749-5-30: 8 str.
- Kotzampassi K., Gimarellos-Bourboulis E.J. 2012. Probiotics for infectious diseases: more drugs, less dietary supplementation. International Journal of Antimicrobial Agents, 40, 4: 288-296
- Kurokawa C.S., Sugizaki M.F., Peracoli M.T. 1998. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 40, 3: 125-135
- Kwan C.N., Medoff G., Kobayashi G.S., Schlessinger D., Raskas J.H. 1972. Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2, 2: 61-65
- Labbe A.C., Pepin J., Patino C., Castonguay S., Restier C., Laverdiere M. 2009. A single-centre 10-year experience with *Candida* bloodstream infections. Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, 20, 2: 45-50
- Lass-Flörl C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses, 52, 3: 197-205

- Lherm T., Monet C., Nougire B., Soulier M., Larbi D., Le Gall C., Caen D., Malbrunot C. 2002. Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Intensive Care Medicine*, 28, 6: 797-801
- Liu J., Farmer J.D., Lane W.S., Friedman J., Weissman I., Schreiber S.L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66, 4: 807-815
- Llopis S., Hernandez-Haro C., Monteoliva L., Querol A., Molina M., Fernandez-Espinar M.T. 2014. Pathogenic potential of *Saccharomyces* strains isolated from dietary supplements. *PLoS One*, 9, 5: e98094, doi: 10.1371/journal.pone.0098094: 21 str.
- Lourens-Hattingh A., Viljoen B.C. 2001. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. *Food Research International*, 34, 9: 791-796
- Low C.Y., Rotstein C. 2011. Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Medicine Reports*, 3: 14, doi: 10.3410/M3-14: 8 str.
- Lupetti A., Danesi R., Campa M., Del Tacca M., Kelly S. 2002. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 2: 76-81
- Macfarlane S., Quigley M.E., Hopkins M.J., Newton D.F., Macfarlane G.T. 1998. Polysaccharide degradation by human intestinal bacteria during growth under multi-substrate limiting conditions in a three-stage continuous culture system. *FEMS Microbiology Ecology*, 26, 3: 231-243
- Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. 2012. Brock's biology of microorganisms. 13<sup>th</sup> ed. Boston, Pearson Education: 802-804
- Makinen K., Berger B., Bel-Rhlid R., Ananta E. 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology*, 162, 4: 356-365
- McCullough M.J., Clemons K.V., McCusker J.H., Stevens D.A. 1998. Species identification and virulence attributes of *Saccharomyces boulardii* (nom. inval.). *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 9: 2613-2617
- McCusker J.H., Clemons K.V., Stevens D.A., Davis R.W. 1994. Genetic characterization of pathogenic *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Genetics*, 136, 4: 1261-1269
- McFarland L.V., Bernasconi P. 1993. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative biotherapeutic agent. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6, 1: 157-171
- McFarland L.V. 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 18: 2202-2222
- Meletiadis J., Meis J.F., Mouton J.W., Verweij P.E. 2001. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2: 478-484
- Mičetić-Turk D., Šikić-Pogačar M. 2010. Klinična uporaba probiotikov v pediatriji. *Zdravniški vestnik*, 80, 1: 933-943
- Mitterdorfer G., Mayer H.K., Kneifel W., Viernstein H. 2002. Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 4: 521-530
- Myers R.S. 2006. Immunizing and antimicrobial agents. Washington, University of Washington: 16 str.  
[http://courses.washington.edu/medch401/pdf\\_text/401\\_06\\_VI\\_Antifungal.pdf](http://courses.washington.edu/medch401/pdf_text/401_06_VI_Antifungal.pdf)  
(december 2014)

- Nalbantoglu U., Cakar A., Dogan H., Abaci N., Ustek D., Sayood K., Can H. 2014. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiology*, 41, 1: 42-51
- Nevoigt E. 2008. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 3: 379-412
- Odds F.C. 1993. Effects of temperature on anti-*Candida* activities of antifungal antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 4: 685-691
- Park B.J., Wannemuehler K.A., Marston B.J., Govender N., Pappas P.G., Chiller T.M. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 23, 4: 525-530
- Patel D.M., Riedel D.J. 2013. Fever in immunocompromised hosts. *Emergency Medicine Clinics of North America*, 31, 4: 1059-1071
- Paulus G., Longeart L., Monro A.M. 1994. Human carcinogenic risk assessment based on hormonal effects in a carcinogenicity study in rats with the antifungal agent, fluconazole. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 14, 6: 251-257
- Pausch M.H., Kirsch D.R., Silverman S.J. 2005. *Saccharomyces cerevisiae*: Applications. V: eLS - Encyclopedia of Life Sciences. Battista J. (ed.). New Jersey, John Wiley & Sons: 1 str.  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003885/full> (december 2014)
- Pfizer. 2014. Diflucan U.S. physical prescribing information. New York, Pfizer: 1 str.  
<http://labeling.pfizer.com>ShowLabeling.aspx?id=575> (december 2014)
- Piarroux R., Millon L., Bardonnèt K., Vagner O., Koenig H. 1999. Are live *Saccharomyces* yeasts harmful to patients? *Lancet*, 353, 9167: 1851-1852
- Pravilnik o posebnih zahtevah glede označevanja in predstavljanja predpaketiranih živil. 2014. Uradni list Republike Slovenije, 24, 83: 9065-9066
- Reid G., Jass J., Sebulsky M.T., McCormick J.K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 4: 658-672
- Riquelme A.J., Calvo M.A., Guzman A.M., Depix M.S., Garcia P., Perez C., Arrese M., Labarca J.A. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 36, 1: 41-43
- Roberts R.L., Fink G.R. 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes & Development*, 8, 24: 2974-2985
- Robin E. 2010. Catheter adhesion of different *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from dietary supplements. Master thesis. Gent, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Analysis:49 str.
- Rodrigues A.C., Cara D.C., Fretez S.H., Cunha F.Q., Vieira E.C., Nicoli J.R., Vieira L.Q. 2000. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 3: 404-414
- Roetzer A., Gabaldon T., Schuller C. 2011. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: important adaptations for an opportunistic pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 314, 1: 1-9
- Roy D. 2011. Probiotics. V: Comprehensive biotechnology. 2<sup>nd</sup> ed. Moo-Young M. (ed.). Burlington, Academic Press: 591-602

- Saad N., Delattre C., Urdaci M., Schmitter J.M., Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 1: 1-16
- Sanders M.E. 2000. Probiotic bacteria: Implications for human health. *Journal of Nutrition*, 130, 1: 384-390
- Schiller C., Frohlich C.P., Giessmann T., Siegmund W., Monnikes H., Hosten N., Weitsches W. 2005. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22, 10: 971-979
- Shalini K., Kumar N., Drabu S., Sharma P.K. 2011. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 7, 1: 668-677
- Sigma-Aldrich. 2015a. RPMI Media. St. Louis, Sigma-Aldrich: 1 str.  
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/rpmi-media.html>. (december 2014)
- Sigma-Aldrich. 2015b, Sabouraud dextrose broth. St. Louis, Sigma-Aldrich: 1 str.  
[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/s3306?lang=en&region=SI&gclid=Cj0KEQjw\\_pmoBRDu986bpISz5ZsBEiQANiuHDLNqXzyiaDyHd07Gf5iQE\\_x4FquysMwwWYtAvpYrXSCYaAkLZ8P8HAQ](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/s3306?lang=en&region=SI&gclid=Cj0KEQjw_pmoBRDu986bpISz5ZsBEiQANiuHDLNqXzyiaDyHd07Gf5iQE_x4FquysMwwWYtAvpYrXSCYaAkLZ8P8HAQ) (december 2014)
- Silverglade B., Heller I. 2010. Food labeling chaos. Washington, Center for Science in the Public Interest: 122 str.  
[http://www.cspinet.org/new/pdf/food\\_labeling\\_chaos\\_report.pdf](http://www.cspinet.org/new/pdf/food_labeling_chaos_report.pdf). (december 2014)
- Sobel J.D., Fisher J.F., Kauffman C.A., Newman C.A. 2011. *Candida* urinary tract infections--epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 52, 6: 433-436
- Sobel J.D. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*, 369, 9577: 1961-1971
- Sodja E., Matos T., Simčič S. 2009. Mikrobiološka diagnostika invazivne kandidoze. *Zdravniški vestnik*, 78, 6/7: 321-327
- Stopiglia C.D, Marchese D.P, Heidrich D, Sorrentino J.M, Vieira F.J, Scroferneker M.L. 2012. Comparison between two culture media for *in vitro* evaluation of antifungal susceptibility of the *Sporothrix schenckii* complex. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 87, 4: 561-565
- Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 1: 1-10
- Teshale E.H., Hanson D.L., Wolfe M.I., Brooks J.T., Kaplan J.E., Bort Z., Sullivan P.S. 2007. Reasons for lack of appropriate receipt of primary *Pneumocystis jiroveci* pneumonia prophylaxis among HIV-infected persons receiving treatment in the United States: 1994-2003. *Clinical Infectious Diseases*, 44, 6: 879-883
- Thygesen J.B., Glerup H., Tarp B. 2012. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probioticum. *BMJ Case Reports*. doi: 10.1136/bcr.06.2011.4412: 3 str.
- Tiago F.C., Martins F.S., Souza E.L., Pimenta P.F., Araujo H.R., Castro I.M., Brandao R.L., Nicoli J.R. 2012. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 9: 1194-1207

- Tiballi R.N., Spiegel J.E., Zarins L.T., Kauffman C.A. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* infections and antifungal susceptibility studies by colorimetric and broth macrodilution methods. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 23, 4: 135-140
- Ullah A., Lopes M.I., Brul S., Smits G.J. 2013. Intracellular pH homeostasis in *Candida glabrata* in infection-associated conditions. Microbiology, 159, 4: 803-813
- Uredba (EU) št. 1169/2011 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 25. oktobra 2011 o zagotavljanju informacij o živilih potrošnikom, spremembah uredb (ES) št. 1924/2006 in (ES) št. 1925/2006 Evropskega parlamenta in Sveta ter razveljavitvi Direktive Komisije 87/250/EGS, Direktive Sveta 90/496/EGS, Direktive Komisije 1999/10/ES, Direktive 2000/13/ES Evropskega parlamenta in Sveta, direktiv Komisije 2002/67/ES in 2008/5/ES in Uredbe Komisije (ES) št. 608/2004. 2011. Uradni list Evropske unije, 54, L304: 18-63
- Uredba o izvajanju uredbe (EU) o zagotavljanju informacij o živilih potrošnikom. 2014. Uradni list Republike Slovenije, 24, 6: 428-429
- Van Den Bossche H., Willemse G., Van Cutsem J.M. 1975. The action of miconazole on the growth of *Candida albicans*. Sabouraudia, 13, 1: 63-73
- van der Aa Kuhle A., Jespersen L. 2003. The taxonomic position of *Saccharomyces boulardii* as evaluated by sequence analysis of the D1/D2 domain of 26S rDNA, the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and the mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. Systematic and Applied Microbiology, 26, 4: 564-571
- van der Aa Kuhle A., Skovgaard K., Jespersen L. 2005. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. International Journal of Food Microbiology, 101, 1: 29-39
- Vasiljevic T., Shah N.P. 2008. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18, 7: 714-728
- Vaughan-Martini A., Martini A. 1998. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1883). Vb: The yeasts. 4<sup>th</sup> ed. Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). London, Elsevier: 358-371
- WHO/FAO. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. London Ontario, FAO/WHO: 11 str.  
<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. (december, 2014)
- Yáñez A., Murciano C., Llopis S., Espinar T.F., Gil M.L., Gozalbo D. 2009. *In vivo* and *in vitro* studies on virulence and host responses to *Saccharomyces cerevisiae* clinical and non clinical isolates. Open Mycology Journal, 3, 1: 37-47
- Zilberman M.D., Shorr A.F., Kollef M.H. 2008. Secular trends in candidemia related hospitalization in the United States. Infection Control and Hospital Epidemiology, 29, 10: 978-980
- Zupan J., Avbelj M., Butinar B., Kosel J., Šergan M., Raspor P. 2013a. Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 10: 2496-2505
- Zupan J., Matos T., Cencic A., Raspor P. 2013b. Methodological approaches for unraveling ill-natured moments of generally good-natured *Saccharomyces cerevisiae*. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 124, 1: 379-396

- Zupan J., Raspor P. 2008. Quantitative agar-invasion assay. Journal of Microbiological Methods, 73, 2: 100-104
- Zupan J., Raspor P. 2010. Invasive growth of *Saccharomyces cerevisiae* depends on environmental triggers: a quantitative model. Yeast, 27, 4: 217-228
- Zupan J., Tomičić Z., Raspor P. 2015. Determination of MICING: a new assay for assessing minimal inhibitory concentration for invasive growth. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 34, 5: 1023-1030

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Petru Rasporju, za vključitev v delo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, ter za korekten odnos in vso strokovno pomoč pri pregledu in odločitvah tekom magistrskega dela.

Velik del zahvale gre somentorju dr. Juretu Zupanu. Hvala za vso pomoč pri pripravi in izvedbi eksperimentalnega dela naloge ter za strokovni pregled magistrskega dela. Hvala tudi za vso prijaznost, dobro voljo, spodbujanje in motivacijo, ki sem jo rabil, ko deli eksperimenta niso potekali po pričakovanjih. Zahvaljujem se za spoznanje, da se tudi iz neuspelih laboratorijskih poskusov, da veliko pridobiti.

Zahvaljujem se vsem na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, ki ste mi omogočili odlične pogoje za delo ter mi nudili pomoč, ko sem jo potreboval.

Posebna zahvala gre recenzentu prof. dr. Roku Orlu za strokovni pregled dela, odlične nasvete in pomoč pri poglobljenemu razumevanju tematike.

Nenazadnje pa hvala najboljšim staršem, bratu in punci, ki so me od samega začetka pa do cilja nesobično podpirali tudi ko sem bil »nemogoč« in mi omogočili najboljše pogoje za študij. Vi ste razlog, da lahko uresničujem zastavljene cilje.