

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca MAGNAY

**PRIMERJAVA MIKROBIOTE V BLATU OTROK S
KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZNIJO IN
FUNKCIONALNIMI MOTNJAMI PREBAVIL**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca MAGNAY

**PRIMERJAVA MIKROBIOTE V BLATU OTROK S KRONIČNO
VNETNO ČREVESNO BOLEZNIJO IN FUNKCIONALNIMI
MOTNJAMI PREBAVIL**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

**COMPARISON OF FECAL MICROBIOTA OF CHILDREN WITH
CHRONIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND
FUNCTIONAL BOWEL DISORDERS**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Nutrition

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Prehrana. Delo je bilo opravljeno na Katedri za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Roka Orla, za somentorico znan. svet. dr. Bojano Bogovič Matijašić in za recenzentko prof. dr. Natašo Fidler Mis.

Mentor: prof. dr. Rok Orel

Somentorica: znan. svet. dr. Bojana Bogovič Matijašić

Recenzentka: prof. dr. Nataša Fidler Mis

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana 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.

Mojca Magnay

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 616.34-053.2/.5(043)=163.6
KG črevesje / črevesne bolezni / kronične vnetne črevesne bolezni / ulcerozni kolitis / Crohnova bolezen / prebavila / motnje delovanja / črevesna mikrobiota / blato / otroci
AV MAGNAY, Mojca, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA OREL, Rok (mentor) / BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (somentorica) / FIDLER MIS, Nataša (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2016
IN PRIMERJAVA MIKROBIOTE V BLATU OTROK S KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZNOM IN FUNKCIONALNIMI MOTNJAMI PREBAVIL
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana)
OP XIV, 59 str., 11 pregл., 34 sl., 2 pril., 80 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Kronične vnetne črevesne bolezni in funkcionalne motnje prebavil so kronične bolezni s podobnimi simptomi in ne popolnoma pojasnjenimi vzroki za nastanek. Čeprav nastanek obolenj obeh skupin razlagajo z različnimi teorijami, je vsem omenjenim boleznim skupno, da jih povezujejo tudi s porušenim ravnovesjem črevesne mikrobiote oziroma t.i. disbiozo. Večina preteklih raziskav, ki so obravnavale disbiozo pri bolnikih, je bila opravljena na odrasli populaciji, ne pa na otrocih. V tem delu smo raziskali mikrobioto blata 30-ih otrok s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi in 30-ih otrok s funkcionalnimi motnjami prebavil, ki so se zdravili na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana, pridobljene rezultate pa smo primerjali med seboj in z literaturo. Uporabili smo analize štetja kolonijskih enot na gojiščih in PCR v realnem času. Ugotovili smo, da so pri bolnikih z vnetnimi boleznimi bolj pogosto in v višjih deležih prisotne nekatere skupine bakterij, za katere se smatra, da imajo neugoden vpliv na ravnovesje mikrobiote v prebavilih. Nasprotno smo ugotovili za nekatere skupine in vrste bakterij, ki veljajo za koristne za človeka. Tako smo potrdili hipotezo, da obstaja razlika med mikrobioto blata obeh preiskovanih skupin otrok, in zaključili, da črevesna mikrobiota otrok s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi najverjetneje bolj odstopa od optimalne mikrobiote kot črevesna mikrobiota otrok s funkcionalnimi motnjami prebavil.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 616.34-053.2/.5(043)=163.6
CX bowel / bowel disease / chronic inflammatory bowel diseases / ulcerative colitis / Crohn disease / gastrointestinal tract / functional disorders / fecal microbiota / feces / children
AU MAGNAY, Mojca
AA OREL, Rok (supervisor) / BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (co-advisor) / FIDLER MIS, Nataša (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2016
TY COMPARISON OF FECAL MICROBIOTA OF CHILDREN WITH CHRONIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND FUNCTIONAL BOWEL DISORDERS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO XIV, 59 p., 11 tab., 34 fig., 2 ann., 80 ref.
LA sl
AI sl/en
AB Both chronic inflammatory bowel diseases and functional bowel disorders are chronological illnesses with similar symptoms and still in need of an exact explanation for the cause. Although there are different theories of causes for these illnesses, all have in common the fact that they are linked with imbalance of bowel microbiota or so-called dysbiosis. Bacterial dysbiosis has been confirmed by majority of studies done on patients with these illnesses, however they mostly focused on adult population, while only a few focused on children. For this thesis we were researching and comparing the fecal microbiota of 30 children with chronic inflammatory bowel disease and 30 children with functional bowel disorders treated at the University Medical Centre Ljubljana, Division of Paediatrics, and compared the findings with each other and with literature. We analysed the feces by counting the number of colonies on growth plates and using PCR in real time. In the fecal microbiota of children with inflammatory diseases we have observed an increase in the amount and the ratio of bacterial groups, known for having a negative effect on health and overall balance of bowel microbiota. In contrast we found a decrease in the amount and ratio of bacteria that are believed to be beneficial for gut homeostasis, as opposed to the fecal microbiota observed in children with functional bowel disorders. We have thus confirmed our hypothesis, in which we expected a difference between the observed fecal microbiota in both groups of children included in the study, and reached a conclusion, that the bowel microbiota of children with chronic inflammatory bowel disease is most probably more out of balance than the bowel microbiota of children with functional bowel disorder.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI	2
2.1.1 Diagnoza KVČB.....	5
2.1.2 Zdravljenje KVČB	5
2.1.2.1 Zdravljenje z zdravili.....	5
2.1.2.2 Prehransko zdravljenje	6
2.1.2.3 Operativno zdravljenje	7
2.1.3 Razširjenost KVČB	7
2.1.4 Vzroki za pojav KVČB	8
2.2 FUNKCIONALNE MOTNJE PREBAVIL	8
2.2.1 Diagnoza FMP	9
2.2.2 Zdravljenje FMP	9
2.2.3 Razširjenost FMP	9
2.2.4 Vzroki za pojav FMP	9
2.3 ČREVESNA MIKROBIOTA	10
2.3.1 Povezava med črevesno mikrobioto in KVČB	12
2.3.2 Povezava med črevesno mikrobioto in FMP	13
3 MATERIAL IN METODE	14
3.1 NAČRT POSKUSA.....	14

3.2 MATERIAL.....	14
3.2.1 Vzorci	14
3.2.2 Gojišča in raztopine.....	14
3.2.2.1 TOS z mupirocinom	14
3.2.2.2 Rogosa	15
3.2.2.3 CATC	15
3.2.2.4 DHL po Sakazaki	16
3.2.2.5 Chromocult® Coliform Agar	16
3.2.2.6 Mannitol Salt Phenol-red agar.....	17
3.2.2.7 Anaerobni diluent	17
3.3 METODE.....	18
3.3.1 Štetje kolonijskih enot na ploščah.....	18
3.3.1.1 Nacepljanje na plošče in inkubacija	18
3.3.1.2 Ugotavljanje števila kolonijskih enot	21
3.3.2 Analiza PCR v realnem času	21
3.3.2.1 Priprava vzorca za analize PCR v realnem času	21
3.3.2.2 Liza celic.....	22
3.3.2.3 Sonikacija	22
3.3.2.4 Ekstrakcija DNA	22
3.3.2.5 Priprava standarda	22
3.3.2.6 Analiza.....	23
3.3.3 Statistična obdelava podatkov.....	27
4 REZULTATI.....	30
4.1 REZULTATI ŠTETJA KE NA PLOŠČAH.....	30
4.1.1 Opisna statistika rezultatov štetja KE na ploščah.....	30
4.1.1.1 Pregled rezultatov štetja na ploščah.....	30
4.1.1.2 Grafična predstavitev rezultatov štetja na ploščah	30
4.1.2 Statistično testiranje rezultatov štetja na ploščah s testom Wilcoxon-Mann-Whitney	32
4.2 REZULTATI ANALIZE PCR V REALNEM ČASU.....	33
4.2.1 Opisna statistika rezultatov analiz PCR v realnem času	33
4.2.1.1 Pregled rezultatov analize PCR v realnem času	33
4.2.1.2 Grafična predstavitev rezultatov analize PCR v realnem času.....	36
4.2.2 Statistično testiranje rezultatov analiz PCR v realnem času s testom Wilcoxon-Mann-Whitney	40
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	42
5.1 RAZPRAVA.....	42

5.2 SKLEPI.....	48
6 POVZETEK.....	50
7 VIRI	52

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Glavne ugotovitve raziskav, v katerih so primerjali mikrobioto blata bolnikov (KVČB ali FMP) z mikrobioto zdravih osebkov.	11
Preglednica 2: Gojišča in inkubacijski pogoji za pripravo standardov za ciljne bakterijske skupine.....	23
Preglednica 3: Mešanice začetnih oligonukleotidov specifičnih za ciljno skupino bakterij in protokol pomnoževanja.	24
Preglednica 4: Statistični parametri rezultatov štetja različnih skupin bakterij v vzorcih blata otrok s KVČB in otrok s FMP (ostali).....	30
Preglednica 5: Wilcoxon-Mann-Whitney U test - ugotavljanje razlik med skupino KVČB in FMP (ostali) za štetje na ploščah.....	33
Preglednica 6: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času, za vsako od tarčnih bakterijskih skupin (vrste, rodovi, družine ali skupine sorodnih vrst).	34
Preglednica 7: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času za vrsto <i>F. prausnitzii</i>	34
Preglednica 8: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času, za razmerje med vsako izmed tarčnih bakterijskih skupin (vrste, rodovi, družine ali skupine sorodnih vrst) in vsemi bakterijami.	35
Preglednica 9: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času, za razmerje med <i>F. prausnitzii</i> in vsemi bakterijami.....	35
Preglednica 10: Rezultati statistične analize razlik med skupinama KVČB in FMP v rezultatih kvantifikacije različnih skupin bakterij v blatu (št. kopij <i>16S rDNA</i>) z analizo PCR v realnem času. Uporabili smo Wilcoxon-Mann-Whitney U test.....	41
Preglednica 11: Rezultati statistične analize razlik med skupinama KVČB in FMP v rezultatih kvantifikacije različnih skupin bakterij v blatu (razmerje med št. kopij <i>16S rDNA</i> posameznih skupin, oziroma v primeru <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> razmerje med številom celic, in št. kopij <i>16S rDNA</i> za vse bakterije) z analizo PCR v realnem času. Uporabili smo Wilcoxon-Mann-Whitney U test.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Najpogostejsa mesta vnetja pri CB (levo) in pri UK (desno) (Orel in sod., 2009b).2	
Slika 2: Odstotek obolelih otrok in mladostnikov z UK, CB ali NK, pri katerih je prisoten določen simptom ali znak KVČB (Orel in sod., 2009b).	4
Slika 3: Bakterijske kolonije na gojišču TOS z mupirocinom.	15
Slika 4: Bakterijske kolonije na gojišču Rogosa.	15
Slika 5: Bakterijske kolonije na gojišču CATC.	16
Slika 6: Bakterijske kolonije na gojišču DHL po Sakazaki.....	16
Slika 7: Bakterijske kolonije na gojišču Chromocult® Coliform Agar.	17
Slika 8: Bakterijske kolonije na gojišču Mannitol Salt Phenol-red agar.....	17
Slika 9: Shema priprave in inkubacije vzorcev za štetje kolonijskih enot na ploščah.	20
Slika 10: Primer razvrstitev vzorcev in standardov na mikotitrski plošči, kot je predstavljena v programu MxPro. V tem primeru gre za analize PCR v realnem času za bakterijsko DNA vseh bakterij, izolirano iz vzorcev blata, ki so nosili laboratorijske oznake od 31 do 63.	25
Slika 11: Primer poteka analize PCR v realnem času (temperaturni režimi), kot je predstavljena v programu MxPro. V tem primeru gre za analize PCR v realnem času za vse bakterije.	26
Slika 12: Primer poteka analize PCR v realnem času (zaznavanje fluorescence), kot je predstavljena v programu MxPro. V tem primeru gre za analize PCR v realnem času za bakterijsko DNA vseh bakterij, pridobljeno iz vzorcev blata, ki so nosili laboratorijsko oznako od 31 do 63 (kot predstavljene tudi na sliki 11).....	27
Slika 13: Število (log KE/g) bakterij rodu <i>Bifidobacterium</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.	31
Slika 14: Število (log KE/g) bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.	31
Slika 15: Število (log KE/g) bakterij rodu <i>Enterococcus</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.	31
Slika 16: Število (log KE/g) bakterij družine <i>Enterobacteriaceae</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.	31
Slika 17: Število (log KE/g) bakterij vrste <i>Escherichia coli</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.	32
Slika 18: Število (log KE/g) koliformnih bakterij v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.	32

Slika 19: Število (log KE/g) bakterij rodu <i>Staphylococcus</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.....	32
Slika 20: Prisotnost vseh bakterij v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali)-kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij <i>16S rDNA</i> v g blata.....	36
Slika 21: Prisotnost rodu <i>Bifidobacterium</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij <i>16S rDNA</i> v g blata.	37
Slika 22: Razmerje med številom kopij <i>16S rDNA</i> rodu <i>Bifidobacterium</i> in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.....	37
Slika 23: Prisotnost skupine <i>Clostridium leptum</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij <i>16S rDNA</i> v g blata.	37
Slika 24: Razmerje med številom kopij <i>16S rDNA Clostridium leptum</i> in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.....	37
Slika 25: Prisotnost skupine <i>Clostridium coccoides</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij <i>16S rDNA</i> v g blata.	38
Slika 26: Razmerje med številom kopij <i>16S rDNA</i> skupine <i>Clostridium coccoides</i> in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.....	38
Slika 27: Prisotnost bakterij skupine <i>Bacteroides-Prevotella</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij <i>16S rDNA</i> v g blata.	38
Slika 28: Razmerje med številom kopij <i>16S rDNA</i> skupine <i>Bacteroides-Prevotella</i> in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.....	38
Slika 29: Prisotnost družine <i>Enterobacteriaceae</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij <i>16S rDNA</i> v g blata.	39
Slika 30: Razmerje med številom kopij <i>16S rDNA</i> družine <i>Enterobacteriaceae</i> in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.....	39
Slika 31: Prisotnost vrste <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila celic v gramu blata....	39

Slika 32: Razmerje med številom celic vrste <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.	39
Slika 33: Prisotnost vrste <i>Enterococcus faecalis</i> v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij <i>16S rDNA</i> v gramu blata.	40
Slika 34: Razmerje med številom kopij <i>16S rDNA Enterococcus faecalis</i> in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram. Osamelci so bili zaradi boljše preglednosti odstranjeni.	40

KAZALO PRILOG

PRILOGA A

Priloga A1: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Bifidobacterium*.

Priloga A2: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Lactobacillus*.

Priloga A3: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterococcus*.

Priloga A4: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterobacteriaceae*.

Priloga A5: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Escherichia coli*.

Priloga A6: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za koliformne bakterije.

Priloga A7: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Staphylococcus*.

PRILOGA B

Priloga B1: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za vse bakterije.

Priloga B2: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Bifidobacterium*.

Priloga B3: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Bifidobacterium*/vse bakterije.

Priloga B4: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Clostridium leptum*.

Priloga B5: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Clostridium leptum*/vse bakterije.

Priloga B6: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Clostridium coccoides*.

Priloga B7: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Clostridium coccoides*/vse bakterije.

Priloga B8: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Bacteroides-Prevotella*.

Priloga B9: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Bacteroides-Prevotella*/vse bakterije.

Priloga B10: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterobacteriaceae*.

Priloga B11: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Enterobacteriaceae*/vse bakterije.

Priloga B12: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Faecalibacterium prausnitzii*.

Priloga B13: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Faecalibacterium prausnitzii*/vse bakterije.

Priloga B14: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterococcus faecalis*.

Priloga B15: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Enterococcus faecalis*/vse bakterije.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<i>16S rDNA</i>	gen za ribosomsko podenoto 16S
<i>16S rRNA</i>	ribosomska podenota 16S
<i>C. coccoides</i>	<i>Clostridium coccoides</i>
<i>C. leptum</i>	<i>Clostridium leptum</i>
CB	Crohnova bolezen
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>ESPGHAN</i>	Evropskega združenje za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ang. The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition)
<i>F. prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
FMP	funkcionalne motnje prebavil
KE	kolonijske enote
KE/g	kolonijske enote na gram
KVČB	kronične vnetne črevesne bolezni
NK	neopredeljena kronična vnetna črevesna bolezen
p	vrednost, ki označuje statistično verjetnost
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
SRČ	sindrom razdražljivega čревsa
št.	število
UK	ulcerozni kolitis
UKC	Univerzitetni klinični center

1 UVOD

Skupino bolezni, za katere je značilno kronično vnetje črevesja neznane etiologije, imenujemo kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB). Vzroki za pojav KVČB so neznani, najverjetnejše pa gre za kombinacijo genetskih, imunskeih in okoljskih dejavnikov (Hyams, 2007). Čeprav so KVČB relativno redke, se pogostost le-teh v razvitih državah povečuje, iz česar je mogoče sklepati, da pomembni dejavniki za pojav teh bolezni izvirajo tudi iz okolja (M'Koma, 2013). Vse več teorij govorji o mikrobioloških dejavnikih, saj kaže, da pri obolelih za kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi pride do nenormalnega odziva črevesnega imunskega sistema na prisotno črevesno mikrobioto. Nekatere teorije tako govorijo o tem, da je lahko en od razlogov za porast števila obolelih za KVČB sprememba sestave črevesne mikrobiote oziroma disbioza, ki je posledica modernega načina življenja (Geier in sod., 2007; Kanauchi in sod., 2003; Ott in sod., 2004).

Funkcionalne motnje prebavil so kombinacija kroničnih in ponavljačih se simptomov, ki niso posledica nobenih znanih organskih obolenj. Najbolj znan primer funkcionalnih motenj prebavil je sindrom razdražljivega črevesa, za katerega so značilne trebušne bolečine ali nelagodje, ki jih spremljajo spremembe v pogostosti odvajanja ali trdoti blata (Longstreth in sod., 2006). Vzroki za sindrom razdražljivega črevesa še niso povsem pojasnjeni, zelo verjetno pa tudi tu odigra vlogo porušeno razmerje v črevesni mikrobioti (McFarland in Dublin, 2008).

Večina raziskav sestave črevesne mikrobiote pri bolnikih s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi in funkcionalnimi motnjami prebavil je bila narejenih na odraslih bolnikih, študij, ki bi bile narejene na pediatrični populaciji, pa je malo.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen magistrske naloge je bil z različnimi mikrobiološkimi metodami raziskati sestavo bakterijske mikrobiote v blatu otrok in mladostnikov s kroničnimi vnetnimi črevesnimi boleznimi in s funkcionalnimi motnjami prebavil (predvsem sindromom razdražljivega črevesa) ter statistično ovrednotiti morebitne razlike med skupinama.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da se bo sestava mikrobiote v blatu otrok s KVČB razlikovala od mikrobiote v blatu otrok s funkcionalnimi motnjami prebavil.

2 PREGLED OBJAV

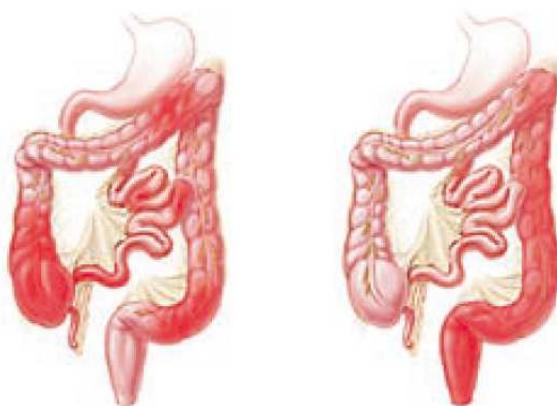
2.1 KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI

Z imenom kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB) poimenujemo skupino bolezni, za katere je značilno kronično vnetje črevesa neznane etiologije, pomembno vlogo pri njihovem razvoju pa imajo genetski in imunski dejavniki ter dejavniki okolja. Za vse bolezni iz skupine KVČB so značilni nepredvidljivi zagoni in remisije (Hyams, 2007). Ločimo tri osnovne oblike KVČB: Crohnovo bolezen, ulcerozni kolitis in neopredeljeno KVČB.

Crohnova bolezen (CB) lahko prizadene katerikoli del prebavil, od ust do zadnjika (Hyams, 2007).

Ulcerozni kolitis (UK) je vnetje debelega črevesa. Lahko je vnet le del ali pa celo debelo črevo, skoraj vedno pa je vnet končni del črevesa, danka (Orel in sod., 2009b). Od tu izvira tudi ime bolezni, saj uporabljamo izraz »ulkus« za rano oz. čir, kolitis pa je izraz za vnetje širokega črevesja (Hyams, 2007).

Čeprav sta si CB in UK med seboj precej podobna, je med njima kar nekaj razlik, predvsem glede na dele prebavil, ki so prizadeti (slika 1). Pri CB sta najpogosteje vneta končni del ozkega črevesa in debelo črevo, vnetje je acentrično in segmentno, z izmenjujočimi neprizadetimi in prizadetimi deli prebavil (Hyams, 2007; Orel in sod., 2009b). Medtem ko je pri UK v večini primerov prizadeta le črevesna sluznica, je pri CB vnetje prisotno v vseh plasteh črevesne stene (Hyams, 2007; Sedmak, 1995). Pri otrocih s CB je vnetje v začetnih fazah bolezni opazno predvsem v vitem črevesu in kolonu, v 30 % primerov je prisotno izključno v tankem črevesu, v 10-15 % pa izključno v debelem črevesu (Hyams, 2007).

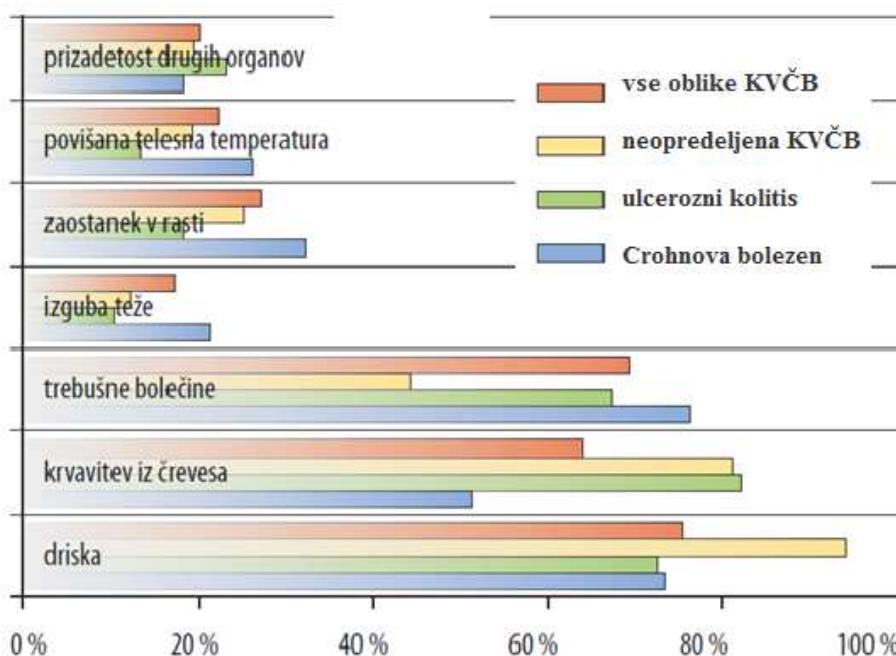


Slika 1: Najpogostejša mesta vnetja pri CB (levo) in pri UK (desno) (Orel in sod., 2009b).

Kot **neopredeljena KVČB** (NK) poimenujemo tiste oblike bolezni, ki ne ustrezajo niti sliki CB niti sliki UK. V to skupino se uvršča le 10 % otrok s KVČB (Hyams, 2007).

Do pojava vnetnih črevesnih bolezni pride najpogosteje v mladosti, pri 25 % bolnikih se bolezen pojavi prvič pred dopolnjenim 20. letom. Bolezen se lahko pojavi tudi že pred dopolnjenim 1. letom starosti, pojavljanje bolezni v zgodnjem otroštvu pa je vse bolj pogosto. Pri otrocih z zgodnjim pojavom vnetne bolezni črevesja je večja verjetnost za napredovanje bolezni v kronično vnetje črevesja (Hyams, 2007; Orel, 1995).

Klinična slika KVČB je odvisna od lokalizacije vnetja, aktivnosti vnetja in prisotnosti zapletov. Začetek obolenja CB je običajno postopen in neznačilen, tako da od prvih simptomov do postavitve diagnoze lahko mine tudi več mesecev ali celo let, s časom pa se lahko simptomi tudi spreminjajo (Hyams, 2007; Sedmak, 1995), medtem ko se pri obolenju za UK že v začetku obolenja pojavi krvavo tekoče blato, zato bolezen hitro odkrijejo (Kolar, 2004). Pri pacientih s prizadetim tankim črevesom se pogosto pojavi bolečina v desnem spodnjem delu trebuha, pri pacientih z vnetim kolonom pa se pojavljajo simptomi, značilni za vnetje, kot so driska (pri 2/3 bolnih otrok), krvavitve (najpogosteje krvava driska, medtem ko so masivne krvavitve redke), krči itd. (Sedmak, 1995). Pogosto so prisotni tudi sistemski simptomi, kot na primer vročina (pri 50 % otrok), slabo počutje in hitra utrujenost. Zaostalost v rasti in razvoju je lahko tudi eden od simptomov (pri 40 % otrok) ali celo edini prisotni simptom, in je posledica nezadostnega vnosa hranil zaradi neješčnosti, slabe absorpcije hranil, povečanih gastrointestinalnih izgub zaradi driske in povečanih potreb zaradi kroničnega vnetnega procesa (Hyams, 2007; Sedmak, 1995). Kadar je vnetje prisotno v želodcu in dvanajstniku lahko pride do bruhanja in bolečine v osrednjem delu trebuha. Pri nekaterih bolnikih zaradi vnetja in brazgotinjenja nastanejo obstrukcije (zožitve črevesa), ki lahko ovirajo pretok črevesne vsebine, kar vodi v pojav bolečine in krčev v trebuhu ali povečanega obsega trebuhu (Hyams, 2007).



Slika 2: Odstotek obolelih otrok in mladostnikov z UK, CB ali NK, pri katerih je prisoten določen simptom ali znak KVČB (Orel in sod., 2009b).

Vnetje, ki zajame celotno debelino črevesne stene, lahko vodi v nastanek fistul (bolezenskih povezav) med sosednjima črevesnima vijugama, črevesom in drugim votlim organom (mehurjem, nožnico,...) ali črevesom in kožo. Medtem, ko so fistule med dvema deloma črevesa večinoma brez simptomov, se fistule med črevesom in mehurjem lahko kažejo kot vnetje sečil ali prisotnost zraka ali blata v urinu, fistule med črevesom (predel danke) in nožnico kot fekalni izcedek iz nožnice, fistule med črevesom in kožo pa so najpogosteje prisotne v predelu anusa in se kažejo kot bolečina na tem mestu. Če pride do abscesa (področje gnojne vsebine) v abdominalno odprtino, lahko pride do povišane temperature in bolečin (Hyams, 2007).

Simptomi, ki niso povezani s črevesjem, se pogosteje kažejo pri CB kot pri UK. Simptomi, ki so lahko posledica CB so na primer razjede v ustih, periferni artritis in ledvični ter žolčni kamni (Hyams, 2007).

Bolezen zaradi svojih simptomov vpliva na kakovost življenga obolelega otroka. Vendar se pri večini otrok simptomi ne pojavljajo stalno in so prisotni le v času ponovnih zagonov bolezni, ki pa so težko predvidljivi (Hyams, 2007; Sedmak, 1995). Do izbruha bolezni lahko pride iz različnih razlogov, kot so na primer okužba dihal, stres, antibiotično zdravljenje, jemanje nesteroidnih protivnetnih zdravil, lahko pa pride do izbruha brez jasnega razloga (Sedmak, 1995).

2.1.1 Diagnoza KVČB

Paciente, pri katerih se pojavi sum na KVČB, pregleda pediater-gastroenterolog. Diagnostika poteka po priporočilih Evropskega združenja za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano (ESPGHAN) po tako imenovanih »Portskih kriterijih« (Orel in sod., 2009b). Tako se po priporočilih opravi pregled zgodovine pacientovih simptomov preko pogovora s pacientom oziroma njegovimi starši in pregled pacienta. Sledijo laboratorijske preiskave blata in krvi ter ultrazvočni pregled trebuha, kjer se pri otrocih s KVČB lahko odkrije slabokrvnost, prisotnost kazalcev vnetja (zvišana koncentracija levkocitov v krvi, pospešena sedimentacija eritrocitov, povišana koncentracija trombocitov in C-reaktivnega proteina) in določene značilne skupine protiteles. Po potrebi se opravijo tudi dodatne preiskave, s pomočjo katerih želimo izločiti nekatere bolezni s podobnimi simptomimi, kot so določene črevesne okužbe in prehranske alergije. Sledi endoskopska preiskava zgornjega (požiralnika, želodca in dvanaestnika) in spodnjega (debelega in končnega dela tankega črevesa) dela prebavil z biopsijami vsakega segmenta prebavnega trakta. Odvzete biopte se nato pregleda s pomočjo mikroskopa, pri čemer iščejo prisotnost značilnih bolezenskih sprememb. Za pregled tankega črevesa, ki ga ni mogoče pregledati z endoskopskim inštrumentom, se opravijo rentgenske kontrastne preiskave in po potrebi tomografija ali magnetnoresonančno slikanje prebavil. Lahko se opravi tudi kapsulna endoskopija, pri kateri otrok zaužije majhno kapsulo s kamero, ki zbirajo slike pacientovih prebavil (Escher in sod., 2005; Orel in sod., 2009b).

2.1.2 Zdravljenje KVČB

Trenutno ni zdravil, ki bi odpravila KVČB, z različnimi terapijami pa je mogoče omejiti vnetje, omiliti simptome, doseči remisijo (zdravljenje zagonov aktivne bolezni) in zmanjšati možnost ponovnega zagona (vzdrževalno zdravljenje). Katero vrsto terapije izbere gastroenterolog je odvisno od tipa in teže bolezni, mesta vnetja, morebitne prizadetosti ostalih organov, splošnega stanja in starosti, odziva na terapije ter preferenc pacienta (Hyams, 2007; Logar-Car, 1995). Zdravljenje obsega zdravljenje z zdravili, zdravljenje s prehrano in/ali operativno zdravljenje (Logar-Car, 1995).

2.1.2.1 Zdravljenje z zdravili

Za zdravljenje KVČB se uporabljajo naslednje skupine zdravil: protivnetna zdravila, imunosupresivna zdravila, biološka zdravila in antibiotiki (Logar-Car, 1995; Orel in sod., 2009b). Po trenutno veljavnih smernicah zdravljenje otrok poteka po stopnjah (angl. step-up approach), najprej s blažjimi nesteroidnimi protivnetnimi zdravili, kot so aminosalicilati, ki se obenem uporabljajo tudi za vzdrževanje remisije in imajo malo nezaželenih učinkov (Brecelj, 2014; Ferkolj, 2004).

Po stopenjskem pristopu se zdravljenje nato nadaljuje s steroidi, razen pri CB, kjer se zdravljenje usmeri bolj k prehranskemu zdravljenju z enteralno prehrano (Brecelj, 2014). Kortikosteroidi so hormoni nadledvične žleze, ki se uporablja za zdravljenje srednje težkih in težkih oblik KVČB ter delujejo protivnetno. Zdravila so uspešna v 80 % primerov, njihovi učinki pa so opazni po 5-10 dneh uporabe. Uporablja se za zdravljenje aktivnega črevesnega vnetja, vendar ne preprečujejo ponovnega zagona bolezni (Orel in sod., 2009b; Logar-Car, 1995). Poleg tega imajo kortikosteroidi številne neželene učinke, kot so spremembe telesne presnove, videza (kopičenje maščobe v trupu in obrazu), atrofija kože s pojavom strij, bolezenska poraščenost, zmanjšanje mineralne kostne gostote, povečana dovzetnost za okužbe, psihične spremembe in drugo (Ferkolj, 2004).

Pogosto se zdravljenju s steroidi dodajajo imunomodulatorna zdravila (Brecelj, 2014). Ta zdravila delujejo na imunski sistem in zavirajo proizvodnjo vnetnih citokinov. Tako oblika zdravljenja večinoma uspešno zmanjša vnetje, vendar pa jo spremljajo pogosti stranski učinki. Ob uporabi azotropina so ti prisotni pri 10-15 % bolnikov in vključujejo alergije, pankreatitis, zavore kostnega mozga in toksični hepatitis (Fakhoury in sod., 2014; Ferkolj, 2004).

V kolikor tako zdravljenje ni zadostno, se prične zdravljenje z biološkimi zdravili. Najbolj pogosto uporabljamo monoklonska protitelesa proti provnetnemu citokinu TNF- α , ki je najpomembnejši mediator vnetja pri CB in UK (Brecelj, 2014; Ferkolj, 2004).

Antibiotiki se uporablja pri bolnikih z zapleti, kot so fistule, in za preprečevanje razrasta bakterij v primerih prizadetega tankega črevesa (Bernstein, 2014; Ferkolj, 2004). Vse več pa se antibiotiki omenjajo kot zdravila, ki bi se lahko v prihodnosti pogosteje uporabila z namenom modulacije črevesne mikrobiote in odpravljanje disbioze, kar bi lahko pomagalo odpraviti vnetje pri bolnikih (Ohkusa in Sato, 2005).

2.1.2.2 Prehransko zdravljenje

Pri otrocih s KVČB se pogosto pojavi zaostanek v rasti, navadno zaradi nezadostnega vnosa ali izgub hrani, kot posledica pospešene izgubi zaradi prisotnosti drisk. Nekatera od zdravil imajo lahko prav tako učinek na rast in razvoj otroka (kortikosteroidi) (Brecelj, 2014; Logar-Car, 1995; Orel in sod., 2009b). Pacientom zato priporočajo uživanje katerega od pripravkov enteralne prehrane, ki so najpogosteje v obliki napitkov z optimalno količino makrohranil (beljakovine, v posebnih primerih aminokisline, ogljikovi hidrati in maščobe), vitaminov, mineralov in elementov v sledovih. Pripravki za enteralno prehrano se lahko uživajo kot dodatek k redni prehrani ali kot popolno nadomestilo prehrane, kjer je dovoljena le enteralna oblika prehrane in pitje vode, nesladkanega zeliščnega čaja ter žvečilnega gumija brez sladkorja. Enteralni pripravki se vsrkajo v kri že v zgornjem delu tankega črevesa, spodnji del tankega črevesa in debelo črevo pa pri

absorpciji hranil nista aktivna, kar je ključno za uspešnost takega zdravljenja. Pri otrocih s CB je enteralna prehrana lahko samostojna terapija za doseganje umirivte vnetja, medtem ko je pri ostalih oblikah KVČB le dodatek k drugim načinom zdravljenja. Kadar se uporablja popolna enteralna prehrana, traja terapija 4-8 tednov, prehod nazaj na običajno prehrano pa je postopen in traja nekaj tednov. Prednost takega zdravljenja je predvsem odsotnost neželenih stranskih učinkov (Logar-Car, 1995; Orel in sod., 2009b).

2.1.2.3 Operativno zdravljenje

Uporablja se predvsem pri zapletih KVČB, kot so na primer fistule in obstrukcije črevesa. Redkeje, kadar je navkljub zdravljenju UK vnetje še vedno prisotno, se operativno zdravi bolezen samo. V teh primerih se debelo črevo odstrani v celoti, iz dela ozkega črevesa pa se oblikuje »pouch«, ki kasneje prevzame nalogu odstranjenega dela črevesa. Pri CB operativno odstranjevanje črevesa ne predstavlja dokončnega zdravljenja bolezni, zato se le tega redko poslužujejo (Orel in sod., 2009b; Logar-Car, 1995).

2.1.3 Razširjenost KVČB

M'Koma (2013) je v svojem preglednem članku, v katerem omenja 3.028 različnih objav na temo KVČB, ugotovil, da se po vsem svetu iz leta v leto povečuje pojavnost KVČB. Najbolj opazen porast po letu 1950 je mogoče zaznati predvsem v zahodni Evropi in severni Ameriki, torej v bolj razvitih državah, kjer izredno hitrega porast ni mogoče razložiti izključno z genetsko predispozicijo za nastanek bolezni. Porast pojavnosti UK je bil v razvitih državah sveta predvsem opazen v šestdesetih in sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, kasneje se je število ustalilo, medtem ko je pojavnost za CB še vedno v porastu v večini držav razvitega sveta. Čeprav so bile te bolezni v preteklosti prisotne predvsem pri populaciji bele rase, še predvsem pri ljudeh židovskega porekla, se v zadnjih letih vse več pojavljajo tudi pri ostalih narodnostih sveta in dandanes veljajo za globalne bolezni. V deželah v razvoju so imeli v preteklosti precej manjšo razširjenost KVČB kot v razvitih, vendar je število obolelih narastlo sočasno s povečano industrializacijo teh dežel.

V pregledni študiji, ki so jo opravili Molodecky in sod. (2012), so zbrali različne objave med leti 1930 in 2008, ki so analizirale letno pojavnost KVČB v različnih delih sveta. V Evropi so zabeležili letno pojavnost CB med 0,3 in 12,7 obolelih na 100.000 ljudi, letno pojavnost UK pa med 0,6 in 24,3 obolelih na 100.000 ljudi. Razširjenost je tako ocenjena na 4,9-505 obolelih za UK na 100.000 prebivalcev Evrope, in 0,6-322 obolelih za CB na 100.000 prebivalcev Evrope. Ugotovili so tudi, da so rezultati študij nedosledni glede vloge spola, zato najverjetneje lahko sklepamo, da spol pri verjetnosti za razvoj bolezni ne igra vloge.

Tudi v Sloveniji je bilo od leta 1994 opravljenih nekaj raziskav, ki so obravnavale razširjenost KVČB prav med otroci starimi med 0 in 18 let. V prvi študiji, ki je

obravnavala centralno in jugozahodno Slovenijo med letom 1994 in 1999, je bil zabeležen porast letne pojavnosti z 3,04 na 5,14 na 100.000 otrok (Orel in sod., 2009a). V drugi študiji, opravljeni na predelu severovzhodne Slovenije v kasnejšem obdobju med letoma 2002 in 2010, je bila zabeležena letna pojavnost še višja, in sicer 7,6 obolelih na 100.000 otrok (Urlep in sod., 2014). V najnovejši raziskavi, opravljeni na področju celotne Slovenije med leti 2002 in 2010, so Urlep in sod. (2015) zaključili, da je pojavnost KVČB v celotni Sloveniji med otroško populacijo do nedavnega naraščala in se po obdobju 2005-2007 ustalila na 7,6 obolelih na 100.000 otrok letno, kar je v primerjavi z ostalimi raziskavami opravljenimi na svetovni populaciji visoko in primerljivo z zahodnoevropskimi državami. Obenem so odkrili, da je letna pojavnost CB 4,5 obolelih na 100.000 otrok, letna pojavnost UK pa 2,9 obolelih na 100.000 otrok. V omenjeni raziskavi so tudi odkrili velike razlike med regijami v Sloveniji, kar povezujejo predvsem z možnostjo vpliva različnih prehranskih navad med regijami.

2.1.4 Vzroki za pojav KVČB

Natančnih vzrokov za pojav KVČB ne poznamo. Raziskave kažejo, da so v razvoj KVČB vključeni tako okoljski kot genetski dejavniki. Raziskave opravljene, na eno- in dvojajčnih dvojčkih, kažejo, da genetski dejavnik zagotovo vpliva na razvoj bolezni (Hyams, 2007), vendar je malo verjetno, da je ključnega pomena za pojav KVČB (Benchimol in sod., 2011; M'Koma, 2013). Tudi dejstva, da bile v preteklosti KVČB prisotne predvsem v razvitem svetu, danes pa so vse pogosteje tudi v državah v razvoju, in da je mogoče opaziti direktno povezavo z industrializacijo, govorijo o tem, da so okoljski dejavniki velikega pomena za pojav bolezni (Benchimol in sod., 2011; M'Koma, 2013). Med te okoljske dejavnike, ki bi lahko vplivali na nastanek KVČB, štejemo prehrano, onesnaževala iz okolja in spremembe mikrobiote črevesja (M'Koma, 2013), več o tem v poglavju 2.3.

2.2 FUNKCIONALNE MOTNJE PREBAVIL

Za funkcionalne motnje prebavil (FMP) so značilni sklopi simptomov, ki pa jih ne povzročajo organske bolezni (npr. vnetja, anatomske nepravilnosti, rak itd.). Tipičen primer je sindrom razdražljivega črevesa (SRČ), za katerega so značilne trebušne bolečine ali nelagodje, ki so mu pridružene spremembe v pogostnosti odvajanja in/ali trdoti blata (Longstreth in sod., 2006). Prisotni so še številni drugi simptomi, kot je na primer potreba po takojšnjem odvajanju blata in občutek neizpraznjenosti po odvajanju, povečan obseg trebuha, napenjanje, močni vetrovi in drugo (Orel, 2010). Pogosto se pri obolelih za FMP opaža tudi psihosocialne spremembe, kot na primer pojav tesnobe in strah, povezan s simptommi bolezni, kar lahko bistveno zmanjša kakovost življenja (Emeran in Mayer, 2008).

2.2.1 Diagnoza FMP

Za diagnozo FMP pri otrocih in mladostnikih uporabljamo »Rimske kriterije III«, ki se osredotočajo predvsem na to, kje so simptomi FM prisotni ter kako se izražajo, na primer z bruhanjem in aerofagijo, bolečinami, ter zaprtjem ali inkontinenco. Da postavimo diagnozo za eno od FMP, morajo biti simptomi prisotni 2 meseca ali več (odvisno od vrste diagnoze) (Papadopoulou, 2011).

2.2.2 Zdravljenje FMP

Zdravljenje FMP je odvisno od vrste simptomov. Priporoča se izogibanje dejavnikom, ki sprožijo pojav simptomov, kot so na primer določena živila ali zdravila in stres. V kolikor so ob obolenju prisotni tudi psihosocialni faktorji, se lahko izkaže kot učinkovito tudi zdravljenje z zdravili, kot so antidepresivi, ali terapije pri strokovnjaku za mentalno zdravje (Rasquin in sod., 2006).

Za določene oblike FMP je učinkovito tudi zdravljenje s probiotiki, ki spremenijo sestavo črevesne mikrobiote in posledično njen metabolizem. Tako se lahko zmanjša verjetnost rasti škodljivih vrst mikroorganizmov, zmanjša se proizvodnja črevesnih plinov, in posledično občutek napihnjenosti in obseg trebuha (Orel, 2010).

2.2.3 Razširjenost FMP

Veliko pacientov, ki oboli za FMP, ne išče zdravstvene oskrbe, zato diagnoza pogosto ni postavljena. Zaradi tega nimamo zanesljivih podatkov o razširjenosti FMP, dodatne težave za razumevanje le te pa predstavlja tudi različno postavljanje kriterijev za diagnozo, ki pa se v študijah pogosto postavlja na podlagi vprašalnikov, ki se med sabo razlikujejo (Canavan in sod., 2014; Orel, 2010). Med FMP je najbolj pogost SRČ, ki ga opažajo pri obeh spolih, vendar epidemiološke raziskave kažejo, da je pri ženskah prevelenca opazno višja kot pri moških. Različne študije kažejo, da ima 1-32 % svetovne odrasle populacije SRČ (glavnina študij ocenjuje SRČ pri 10-25 % populacije), oziroma 11-16 % žensk in 7,3-10,5 % moških (Canavan in sod., 2014).

2.2.4 Vzroki za pojav FMP

FMP so najverjetneje posledica enega ali večjega števila genetskih, okoljskih in psihosocialnih faktorjev, kot so: netoleranca za določena živila, povečana visceralna občutljivost in spremenjeno gibanje (motiliteta) prebavil, nepravilnosti v delovanju enteričnega živčnega sistema in aktivnosti imunskega sistema znotraj prebavil, sluzničnega vnetja nizke stopnje, porušenega razmerja v bakterijski mikrobioti (disbioza) in psihogenih dejavnikov (Orel, 2010; Salonen in sod., 2010).

Čeprav FMP niso organska obolenja, med njimi ni stroge ločnice, ampak se v določenih primerih lahko pojavijo kot posledica oziroma stanje po obolenju. Najbolj znan primer FMP je SRČ, ki se lahko prvič pojavi po črevesni okužbi z mikroorganizmi iz skupine *Campylobacter*, *Shigella* ali *Salmonella* (Mättö in sod., 2005; Orel, 2011).

2.3 ČREVESNA MIKROBIOTA

Človeška črevesna mikrobiota je sestavljena iz bilijonov mikroorganizmov številnih vrst, ki se nahajajo v našem črevesju, in delujejo v simbiozi s svojim človeškim gostiteljem (Aziz in sod., 2013). V črevesju različnih ljudi so našli že več kot 1.000 različnih vrst mikroorganizmov (Rajilić-Stojanović in de Vos, 2014). Ta črevesni ekosistem je delno odgovoren za vzdrževanje zdravja ljudi, določene spremembe le-tega pa lahko prispevajo k razvoju nekaterih bolezni. Kot opisujejo Prakash in sod. (2011), imajo mikroorganizmi v črevesju več koristnih funkcij, kot so presnovna (proizvodnja vitaminov, aminokislin in kratko verižnih maščobnih kislin, kot je butirat, znan kot vir energije za črevesne celice), zaščitna (izločanje antimikrobnih snovi, preprečevanje kolonizacije škodljivih organizmov) ter regulacijska (regulacija rasti in diferenciacije epitelnih celic, sodelovanje v razvoju in regulaciji delovanja imunskega sistema). V primerih, ko se sestava mikrobiote črevesja znatno spremeni, tako številčno kakor tudi razmerja med posameznimi predstavniki, tako stanje poimenujemo disbioza. Disbiozo povezujejo s pojavom večjega števila bolezni in motenj, vključno z vnetnimi boleznimi (kamor spadajo tudi vnetne črevesne bolezni), alergijami, SRČ, rakom črevesja in danke, itd.

Vedno več je rezultatov raziskav mikrobiote blata posameznikov s KVČB ali FMP, v primerjavi z zdravimi posamezniki, ki potrjujejo prisotnost disbioze pri bolnikih. Zaradi tega disbiozo smatrajo kot enega od pomembnih faktorjev razvoja bolezni, čeprav še vedno ni znano, ali je disbioza vzrok ali posledica bolezni (Lopetuso in sod., 2013; Salonen in sod., 2010; Sartor, 2008). V preglednici 1 so predstavljene nekatere raziskave, v katerih so ugotavljali prisotnost značilnejših bakterijskih vrst in skupin v fekalni mikrobioti ljudi s KVČB in FMP.

Preglednica 1: Glavne ugotovitve raziskav, v katerih so primerjali mikrobioto blata bolnikov (KVČB ali FMP) z mikrobioto zdravih osebkov.

Skupina/vrsta bakterij	Bolniki s KVČB		Bolniki s FMP, v večini primerov SRČ	
	Glavne ugotovitve	Vir	Glavne ugotovitve	Vir
<i>Bifidobacterium</i>	Manj	Takaishi in sod., 2007	Manj	Shukla in sod., 2015
	Manj v času aktivne bolezni (UK in CB)	Sha in sod., 2012		
	Ni razlike (CB in UK)	Wang in sod., 2014	Ni razlike	Malinen in sod., 2005 Tana in sod., 2010
<i>Lactobacillus</i>	Več	Takaishi in sod., 2007	Več	Tana in sod., 2010
			Manj le v SRČ skupini z drisko	Malinen in sod., 2005
	Ni razlike (CB in UK)	Sokol in sod., 2006 Wang in sod., 2014	Ni razlike	Shukla in sod., 2015
<i>Enterococcus</i>	Več v času aktivne bolezni (CB)	Sokol in sod., 2006	Ni razlike	Tana in sod., 2010 Malinen in sod., 2005
	Več (CB)	Kang in sod., 2010		
	Manj v času aktivne bolezni (UK)	Sokol in sod., 2006		
<i>Enterobacteriaceae</i>			Več pri SRČ z drisko	Carroll in sod., 2012
	Ni razlike	Takaishi in sod., 2007 Sokol in sod., 2006	Ni razlike	Tana in sod., 2010
<i>Escherichia coli</i>	Več (CB in UK)	Sokol in sod., 2006 Wang in sod., 2014	Ni razlike	Malinen in sod., 2005
	Več (CB)	Kang in sod., 2010		

se nadaljuje...

Nadaljevanje preglednice 1: Glavne ugotovitve raziskav, v katerih so primerjali mikrobioto blata bolnikov (KVČB ali FMP) z mikrobioto zdravih osebkov.

Skupina/vrsta bakterij	Bolniki s KVČB		Bolniki s FMP, v večini primerov SRČ	
	Glavne ugotovitve	Vir	Glavne ugotovitve	Vir
<i>Staphylococcus</i>	Ni razlike	Takaishi in sod., 2007		
<i>Clostridium leptum</i>	Manj (CB in UK)	Takaishi in sod., 2007 Kabeerdoss in sod., 2013 Wang in sod., 2014	Ni razlike	Tana in sod., 2010
	Manj (CB)	Kang in sod., 2010		
<i>Clostridium coccoides</i>	Manj (UK in CB)	Takaishi in sod., 2007 Wang in sod., 2014	Manj	Malinen in sod., 2005
	Manj (UK)	Sokol in sod., 2006	Ni razlike	Shukla in sod., 2015 Tana in sod., 2010
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	Manj (aktivno stanje UK in vsa stanja CB)	Sokol in sod., 2006	Ni razlike	Tana in sod., 2010 Malinen in sod., 2005
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Manj (CB in UK)	Kabeerdoss in sod., 2013 Wang in sod., 2014	Manj pri SRČ z drisko	Carroll in sod., 2012
	Manj (CB)	Kang in sod., 2010	Ni razlike	Malinen in sod., 2005

2.3.1 Povezava med črevesno mikrobioto in KVČB

Po sodobnih teorijah so KVČB lahko posledica motenega imunskega odziva na črevesno mikrobioto pri genetsko dovzetnih bolnikih (Geier in sod., 2007; Ott in sod., 2004). Vnetje pri bolnikih s KVČB se najpogosteje pojavlja v delih črevesa, kjer je koncentracija bakterij največja (Thompson-Chagoyan in sod., 2005). Terapije, ki spreminjajo mikrobioto, kot na primer terapije z antibiotiki in prehranske terapije, pa imajo dobre rezultate in vodijo v izboljšanje in remisijo (Geier in sod., 2007; Shanahan, 2004; Fichera in sod., 2005). V črevesju zdravega človeka obstaja simbioza med gostiteljevimi in komenzalnimi bakterijami. Nekateri avtorji pa menijo, da je pri bolnikih s KVČB motena toleranca na

bakterije, kar vodi v povečan imunski odziv in ponavljače se kronično vnetje (Geier in sod., 2007; Kanauchi in sod., 2003).

2.3.2 Povezava med črevesno mikrobioto in FMP

Kaže, da neugodna sestava črevesne mikrobiote lahko spodbuja sluznično vnetje nizke aktivnosti, ki je en od faktorjev pojava FMP (McFarland in Dublin, 2008). Študije, opravljene pri bolnikih s FMP, kot je SRČ, kažejo na to, da je črevesna mikrobiota verjetno en od pomembnih dejavnikov bolezni. Pri pomembnem deležu bolnikov bolezen prvič nastopi prav po bakterijski okužbi prebavil, vendar velja prepričanje, da se mikrobiota bolnikov ne razlikuje samo zaradi prisotnosti posamezne skupine mikroorganizmov. Bolj verjetno je, da je spremenjena sestava celotne mikrobiote značilnost bolnikov s FMP (Mättö in sod., 2005; Salonen in sod., 2010). Študije o posebnostih mikrobiote pri obolelih s FMP imajo nedosledne rezultate in ne dajejo jasne razlage za povezavo, kar je mogoče do neke mere razložiti z razlikami v mikrobioti med posamezniki z različnimi vrstami FMP. Tako na primer opažajo velike razlike v sestavi mikrobiote med tistimi bolniki s SRČ, za katere je značilno zaprtje, in tistimi bolniki z drisko. Pri tem se mikrobiota bolnikov z drisko bolj razlikuje od mikrobiote zdravih kontrolnih skupin, kot je to moč opaziti pri ljudeh z drugimi oblikami FMP (Salonen in sod., 2010; Malinen in sod., 2005; Shukla in sod., 2015). Dejstvo, da uporaba probiotikov pogosto izboljša stanje pri pacientih z nekaterimi oblikami FMP, še dodatno potrjuje pomen črevesne mikrobiote pri tej skupini bolezenskih stanj (Korterink in sod., 2014).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT POSKUSA

V raziskavo je bilo vključenih 30 otrok in mladostnikov s KVČB in 30 otrok in mladostnikov s FMP. Otroci obeh skupin se zdravijo na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana. Posamezni bolnik je bil razvrščen v eno ali drugo skupino na podlagi rezultatov kliničnih diagnostičnih preiskav, vključno z endoskopijo prebavil.

Od oseb, vključenih v raziskavo, je bil odvzet po en vzorec blata takoj, ko je bil pacient sprejet k zdravniku, in pred začetkom zdravljenja. V vzorcih smo nato ugotavljali število kolonijskih enot na gram (KE/g) bakterij rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, družine *Enterobacteriaceae*, vrste *Escherichia coli* in koliformnih bakterij. Dodatno smo iz vzorcev osamili bakterijsko DNA in opravili analize PCR v realnem času. S temi analizami smo nato ugotavljali število kopij gena za 16S rRNA v gramu blata (ozioroma število kopij 16S rDNA v gramu blata) za naslednje skupine in vrste bakterij: vse bakterije, družina *Enterobacteriaceae*, rod *Bifidobacterium*, skupine *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides* ter bakterijski vrsti *Faecalibacterium prausnitzii* in *Enterococcus faecalis*.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Vzorci

Raziskava je bila opravljena na 60 vzorcih blata pacientov, ki se zdravijo na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana in so bili v času odvzema stari med 2 in 18 let. Vzorci blata so bili odvzeti pred začetkom zdravljenja. Vzorci, vključeni v analizo, so bili glede na diagnozo pacientov razdeljeni v naslednje skupine:

- vzorci blata pacientov s KVČB (30 vzorcev):
 - vzorci bolnikov s CB (17 vzorcev),
 - vzorci bolnikov z UK (10 vzorcev),
 - vzorci bolnikov z NK (3 vzorcev),
- vzorci blata pacientov s FMP (30 vzorcev).

Vzorci blata so bili po odvzemu do preiskave hranjeni pri temperaturi -80 °C.

3.2.2 Gojišča in raztopine

3.2.2.1 TOS z mupirocinom

Gojišče TOS z mupirocinom je selektivno gojišče za bakterije rodu *Bifidobacterium*. Gojišče je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca (Yakult) tako, da smo zatehtali 12,5 g dehidriranega gojišča v 200 ml deionizirane in mikrofiltrirane vode. Nato smo gojišče 15 minut avtoklavirali na 115 °C. Ko se je gojišče ohladilo (45 °C) smo dodali

500 µl pripravljenе raztopine mupirocina (za založno raztopino smo 50 mg mupirocina (AppliChem) raztopili v 2,5 ml 96 % etanola) in gojišče razlili na petrijeve plošče v aseptičnih pogojih. Ohlajene petrijeve plošče smo do uporabe hranili v hladilniku.



Slika 3: Bakterijske kolonije na gojišču TOS z mupirocinom.

3.2.2.2 Rogosa

Gojišče Rogosa je gojišče za bakterije rodu *Lactobacillus*. Gojišče je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo zatehtali 14,9 g dehidriranega gojišča v 200 ml deionizirane in mikrofiltrirane vode. Nato smo gojišče raztopili v mikrovalovni pečici brez avtoklaviranja. Ko se je gojišče ohladilo (45 °C) smo dodali 260 µl 96 % ocetne kisline (Merck) in gojišče razlili na petrijeve plošče v aseptičnih pogojih. Ohlajene petrijeve plošče smo do uporabe hranili v hladilniku.

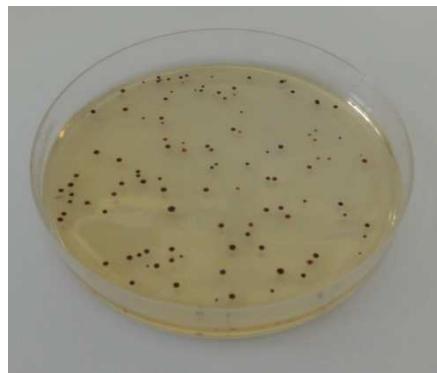


Slika 4: Bakterijske kolonije na gojišču Rogosa.

3.2.2.3 CATC

Gojišče CATC je gojišče za bakterije rodu *Enterococcus*. Gojišče je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca (Merck), tako da smo zatehtali 11,2 g dehidriranega gojišča v 200 ml deionizirane in mikrofiltrirane vode. Nato smo gojišče 15 minut avtoklavirali na 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo (45 °C) smo dodali suplemente: 4 ml 10 % natrijevega karbonata, 2 ml 1 % TTC in 800 µl 10 % natrijevega azida. Vsi suplimenti so bili

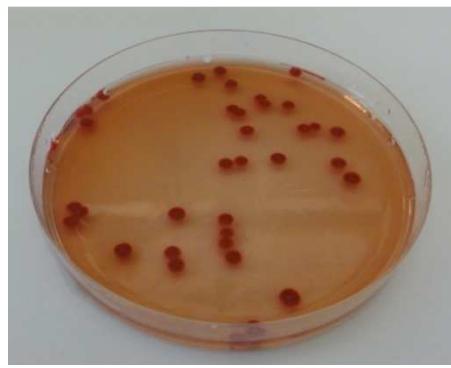
predhodno raztopljeni v deionizirani in mikrofiltrirani vodi ter prefiltrirani. Nato smo gojišče razlili na petrijeve plošče v aseptičnih pogojih. Ohlajene petrijeve plošče smo do uporabe hranili v hladilniku.



Slika 5: Bakterijske kolonije na gojišču CATC.

3.2.2.4 DHL po Sakazaki

Gojišče DHL po Sakazaki je gojišče za bakterije družine *Enterobacteriaceae*. Gojišče je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca (Merck), tako da smo zatehtali 12,8 g dehidriranega gojišča v 200 ml deionizirane in mikrofiltrirane vode. Nato smo gojišče raztoplili v mikrovalovni pečici brez avtoklaviranja in ohlajenega (45°C) razlili na petrijeve plošče v aseptičnih pogojih. Ohlajene petrijeve plošče smo do uporabe hranili v hladilniku.



Slika 6: Bakterijske kolonije na gojišču DHL po Sakazaki.

3.2.2.5 Chromocult® Coliform Agar

Gojišče Chromocult® Coliform Agar je gojišče za bakterije vrste *Escherichia coli* in ugotavljanje števila skupnih koliformnih bakterij. Gojišče je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca (Merck), tako da smo zatehtali 5,3 g dehidriranega gojišča v 200 ml deionizirane in mikrofiltrirane vode. Ohlajenemu gojišču (45°C) smo dodali 800 μl

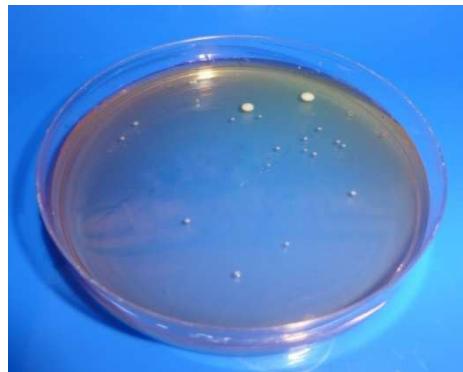
pripravljenega dodatka. Suplement smo pripravili tako, da smo prah ene stekleničke *E. coli*/Coliform Selective Supplement (2,5 mg vankomicin; 2,5 mg cefsulodin; Merck) raztopili v 200 ml sterilne deionizirane in mikrofiltrirane vode. Tako pripravljeno gojišče z dodatkom smo nato razlili na petrijeve plošče v aseptičnih pogojih. Ohlajene petrijeve plošče smo do uporabe hranili v hladilniku.



Slika 7: Bakterijske kolonije na gojišču Chromocult® Coliform Agar.

3.2.2.6 Mannitol Salt Phenol-red agar

Gojišče Mannitol Salt Phenol-red agar je gojišče za bakterije rodu *Staphylococcus*. Gojišče je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca (Merck), tako da smo zatehtali 21,6 g dehidriranega gojišča v 200 ml deionizirane in mikrofiltrirane vode. Nato smo gojišče avtoklavirali 15 minut na 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo (45 °C), smo ga razlili na petrijeve plošče v aseptičnih pogojih. Ohlajene petrijeve plošče smo do uporabe hranili v hladilniku.



Slika 8: Bakterijske kolonije na gojišču Mannitol Salt Phenol-red agar.

3.2.2.7 Anaerobni diluent

Anaerobni diluent smo pripravili tako, da smo v 2 l destilirane vode ob gretju na mešalniku raztopili:

- 2 g peptona,
- 4 g želatine (»porcine gelatine«),
- 17 g NaCl,
- 1,114 g cistein hidroklorid monohidrata.

Nato smo tekočino razdelili v epruvete oz. stekleničke in 15 minut avtoklavirali pri 121 °C.

3.3 METODE

3.3.1 Štetje kolonijskih enot na ploščah

V vzorcih blata smo s štetjem kolonijskih enot (KE) na ploščah ugotavljal število KE bakterij rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, družine *Enterobacteriaceae*, vrste *Escherichia coli* in koliformnih bakterij v g blata (KE/g).

3.3.1.1 Nacepljanje na plošče in inkubacija

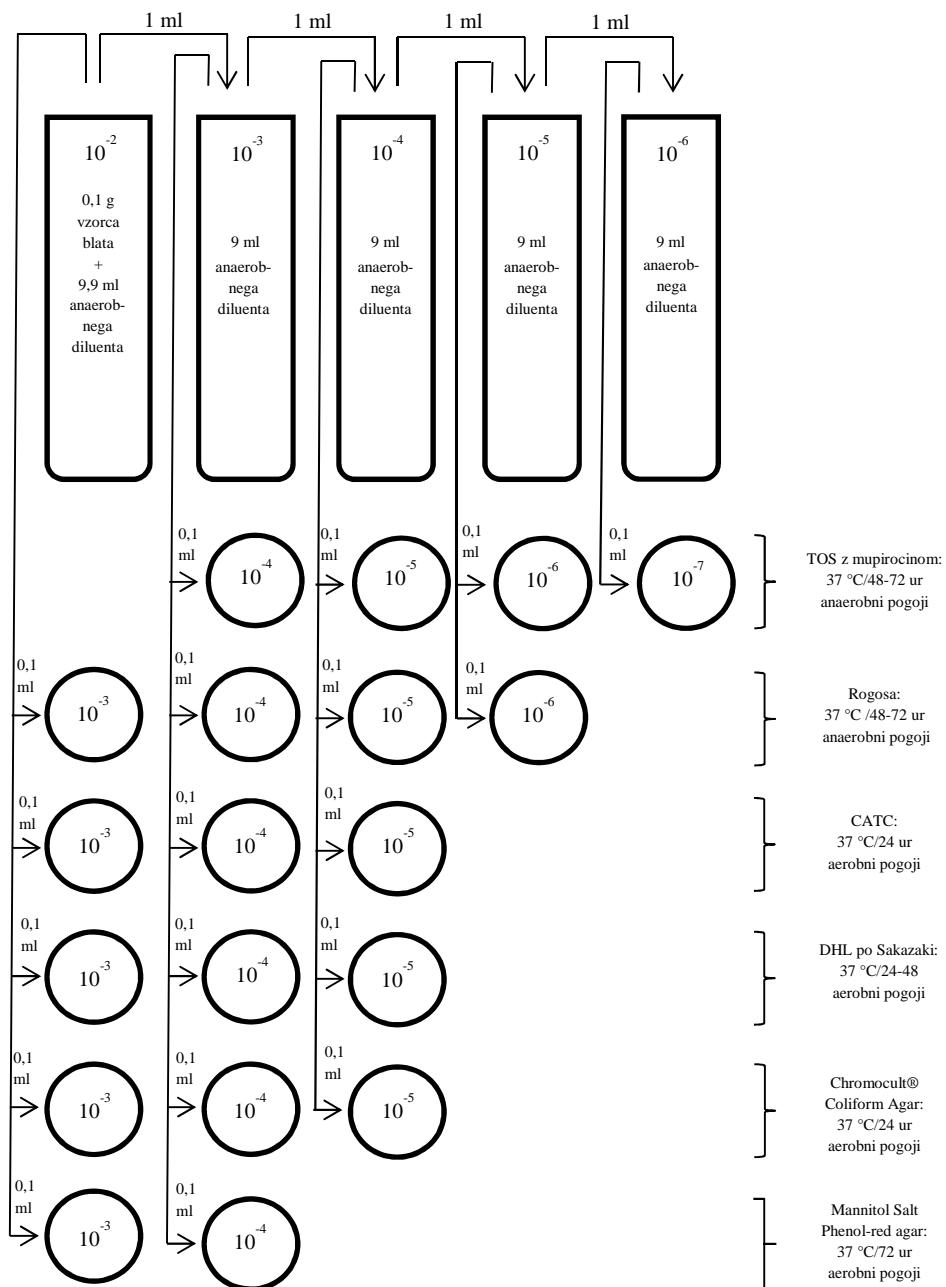
Vzorce blata, hranjene na -80 °C, smo najprej odtalili, nato pa odvzeli 0,1 g vzorca. Vzorec smo razredčili za faktor 100 (10^{-2}) tako, da smo v sterilno plastično centrifugirko volumna 12 ml, ki je vsebovala 0,1 g blata, dolili 9,9 ml anaerobnega diluenta. Nato smo tako pripravljeni vzorec homogenizirali na vrtinčniku (Vortex), kjer smo ga mešali 1 minuto oz. do homogenizacije. Nadaljevali smo z zaporednim 10-kratnim razredčevanjem, do redčitve 10^{-6} .

Razredčene vzorce smo nanesli na petrijeve plošče z gojišči, pripravljenimi, kot je opisano v poglavju 3.2.2. S pipeto s sterilnim nastavkom smo nanesli po 100 µl razredčenega vzorca (npr. 10^{-2}) na površino gojišča in s sterilno hokejko razmazali enakomerno po celotnem gojišču. Na vsakem od gojišč smo pripravili po 2 do 4 različne redčitve vzorcev in jih inkubirali pod naslednjimi pogoji:

- TOS z mupirocinom:
 - Razmazi: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}
 - Inkubacija pri 37 °C 48-72 ur v anaerobnih pogojih.
- Rogosa:
 - Razmazi: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}
 - Inkubacija pri 37 °C 48-72 ur v anaerobnih pogojih.
- CATC:
 - Razmazi: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}
 - Inkubacija pri 37 °C 24 ur v aerobnih pogojih.

- DHL po Sakazaki:
 - Razmazi: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}
 - Inkubacija pri 37°C 24-48 ur v aerobnih pogojih.
- Chromocult® Coliform Agar:
 - Razmazi: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}
 - Inkubacija pri 37°C 24 ur v aerobnih pogojih.
- Mannitol Salt Phenol-red agar:
 - Razmazi: 10^{-3} , 10^{-4}
 - Inkubacija pri 37°C 72 ur v aerobnih pogojih.

Celoten postopek redčitev in nacepljanj na plošče je potekal v aseptičnih pogojih (v laminariju ali ob gorilniku). Postopek je shematsko ponazorjen na sliki 9.



Slika 9: Shema priprave in inkubacije vzorcev za štetje kolonijskih enot na ploščah.

3.3.1.2 Ugotavljanje števila kolonijskih enot

Ko smo zaključili inkubacijo, smo prešteli število kolonij, ki so zrasla na gojiščih. Kot števne smo upoštevali tiste plošče, ki so vsebovale med 10 in 300 kolonij. Pridobljeno število smo nato uporabili za izračun števila KE v gramu vzorca po sledeči formuli (ISO 4833, 2003):

$$N = \frac{\sum KE}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times R} \quad \dots(1)$$

Legenda:

N... število KE v gramu vzorca

$\sum KE$... vsota kolonij, preštetih na vseh števnih ploščah

n_1 ... število števnih kolonij na petrijevi plošči nižje redčitve

n_2 ... število števnih kolonij na petrijevi plošči višje redčitve

R... redčitveni faktor nižje redčitve

Nad mejo detekcije: za namene statistične analize z neparametričnimi preskusi smo neštevnim vzorcem (>300 kolonij na plošči) pripisali vrednost, ki je 2x višja od najvišje vrednosti na števnih ploščah (300 kolonij na plošči), kar je 6×10^7 KE/g (v log enotah 7,78) za *Staphylococcus* oz. 6×10^8 KE/g (v log enotah 8,78) za vse ostale skupine bakterij. Pri nobeni skupini bakterij takih rezultatov ni bilo več kot za dva vzorca.

Pod mejo detekcije: za namene statistične analize smo vzorcem pod mejo detekcije (<10 kolonij na plošči) pripisali vrednost, ki je za polovico manjša od meje detekcije (10 kolonij na plošči), kar je 5000 KE/g za *Bifidobacterium* (v log enotah 3,7) oziroma 500 KE/g (v log enotah 2,7) za vse ostale skupine bakterij.

3.3.2 Analiza PCR v realnem času

Na vzorcih smo opravili analize PCR v realnem času, s pomočjo katerih smo ugotavljali število kopij *16S rDNA* v gramu blata za naslednje skupine in vrste bakterij: vse bakterije, družina *Enterobacteriaceae*, rod *Bifidobacterium*, skupine *Bacteroides-Prevotella*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, in vrsti *Faecalibacterium prausnitzii* ter *Enterococcus faecalis*. Analize smo opravili na instrumentu Stratagene Mx3000P (Stratagene).

3.3.2.1 Priprava vzorca za analize PCR v realnem času

Vzorec blata smo razredčili (na redčitev 10^{-2}) tako, kot je opisano v zgornjem poglavju (3.3.1.1), in odpipetirali dve paralelki 1000 µl tako pripravljenega vzorca v mikropruveto (2 ml). Vzorec smo nato centrifugirali (3600 x g/10 minut/10 °C), supernatant zavrgli,

usedlino pa do nadalnjih analiz hranili na -20 °C. Sledila je liza in sonikacija bakterijskih celic ter ekstrakcija DNA s sistemom Maxwell 16 cell DNA Purification Kit (Promega), po navodilih proizvajalca.

3.3.2.2 Liza celic

Usedlini, ki smo jo pridobili s centrifugiranjem, smo dodali 400 µl pufra TE in 100 µl mešanice lizocima (Sigma Chemical) in mutanolizocima (Sigma Chemical), tako da sta bili končni koncentraciji lizocima 5 mg/ml ter mutanolizocima 5 U/ml. Sledila je inkubacija za 2 uri pri 37 °C.

3.3.2.3 Sonikacija

Za sonikacijo celic smo uporabili sonikator (MSE UK Ltd, Soniprep 150), potekala je v treh ciklih po 30 sekund s 15 sekundnim odmorom. Tekom sonikacije smo mikropruvete hladili v čaši, napolnjeni z ledom.

3.3.2.4 Ekstrakcija DNA

Ekstrakcija DNA je potekala s sistemom Maxwell 16 cell DNA Purification Kit (Promega), po navodilih proizvajalca. Po končanem postopku smo dobili približno 200-300 µl elucijskega pufra z dodano RNAAzo (0,6 µl).

3.3.2.5 Priprava standarda

Za vsako od analiziranih bakterijskih skupin smo pripravili tudi standardni vzorec. Standardno krivuljo smo pripravili tako, da smo v analizo PCR v realnem času vključili vsaj 3 razredčitve standardnega vzorca z DNA, za katerega smo poznali izhodiščno število KE, iz katerih smo izolirali DNA.

DNA, uporabljeno za analize PCR v realnem času, smo izolirali iz prekonočnih kultur (Bogovič Matijašić in sod., 2014). Za vsako od iskanih skupin smo uporabili ustrezna gojišča in inkubacijske pogoje, opisane v preglednici 2. Bakterije so bile preštete s fazno-kontrastno mikroskopijo ob uporabi števne komore Petroff-Hausser (Hausser Scientific) po navodilih proizvajalca. Število bakterij (razen za *F. prausnitzii*) smo v namen relativne kvantifikacije preračunali na ocenjeno število kopij 16S rDNA s pomočjo baze podatkov rrnDB (rrnDB, 2013). Za *F. prausnitzii* tega podatka v rrnDB bazi podatkov ni, zato smo rezultate predstavili kot število celic/g blata. V namen simulacije vpliva matriksa blata na ekstrakcijo DNA in učinkovitost PCR v realnem času, smo čiste kulture združili z blatom (1 ml vzorca blata razredčenega na 1:100), ki je bil pred tem dvakrat avtoklaviran in obdelan z ultravijoličnim sevanjem, da smo zmanjšali vpliv naravno prisotne DNA v blatu. Po centrifugirjanju je bila DNA ekstrahirana, kot je opisano v poglavju 3.3.2.4.

Tako pripravljeno DNA smo nato vključili v analizo PCR v realnem času, opisano v poglavju 3.3.2.6, kot standardni vzorec.

Preglednica 2: Gojišča in inkubacijski pogoji za pripravo standardov za ciljne bakterijske skupine.

Ciljna skupina bakterij (družina, rod, vrsta ali skupina)	Bakterijski sev	Gojišče	Inkubacijski pogoji	Št. ^a
Vse bakterije	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079	modified M2 (Hobson, 1969)	37 °C/18 ur anaerobni pogoji	6
Rod <i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i> BB-12 (Christian Hansen, Denmark)	MRS + 1 % cystein hydrochloride	37 °C/18 ur anaerobni pogoji	4
Skupina <i>Clostridium leptum</i>	<i>Clostridium leptum</i> DSM 753	RCM	37 °C/48 ur anaerobni pogoji	9
Skupina <i>Clostridium coccoides</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i> DSM 933	RCM	37 °C/48 ur anaerobni pogoji	9
Skupina <i>Bacteroides-Prevotella</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> DSM 2079	modified M2 (Hobson, 1969)	37 °C/18 ur anaerobni pogoji	6
Družina <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> K12	BHI	37 °C/24 ur anaerobni pogoji	7
Vrsta <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	M330	37 °C/20 ur anaerobni pogoji	n.p.
Vrsta <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> DSM 20478	M17	37 °C/18 ur aerobni pogoji	4

Legenda:

ATCC... American Type Culture Collection (Rockville, ZDA)

DSM... Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Nemčija)

RCM... Reinforced Clostridial Medium (Merck, Darmstadt, Nemčija)

BHI... Brain Heart Infusion Broth (Merck, Darmstadt, Nemčija)

MRS... De Man Rogosa and Sharpe Medium (Merck, Darmstadt, Nemčija)

M17... (Merck, Darmstadt, Nemčija)

^a... Število kopij gena za 16S rRNA za posamezne vrste, dobljeno iz podatkovne zbirke *rrnDB* (2008)

n.p. ni podatka

3.3.2.6 Analiza

Za reakcijo PCR v realnem času smo pripravili reakcijsko mešanico, ki smo jo razdelili, po 20 µl, v vdolbine na mikrotitrski plošči. 20 µl mešanice je vsebovalo:

- 10 µl Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen),
- 7,4 µl mikrofiltrirane sterilizirane vode,
- 0,08 µl mešanice začetnih oligonukleotidov specifičnih za ciljno skupino bakterij (glej preglednico 3).

Preglednica 3: Mešanice začetnih oligonukleotidov specifičnih za ciljno skupino bakterij in protokol pomnoževanja.

Iskana skupina bakterij (družina ali rod ali vrsta)	Kombinacija začetnih oligonukleotidov	Program pomnoževanja	Vir
Vse bakterije	Eub338F Eub518R	35 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 60 s/95 °C • 30 s/53 °C • 60 s/72 °C 	Fierer in sod., 2005
<i>Bifidobacterium</i>	Bif-F Bif-R	40 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 15 s/95 °C • 15 s/59 °C • 30 s/72 °C 	Rinttilä in sod., 2004
<i>Clostridium leptum</i>	S-* <i>-Clos-0561-a-S-17</i> S-* <i>-Clept-1129-a-A-17</i>	40 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 60 s/94 °C • 60 s/60 °C • 60 s/72 °C 	Van Dyke in McCarthy, 2002
<i>Clostridium coccoides</i>	g-Ccoc-F g-Ccoc-R	40 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 20 s/94 °C • 20 s/50 °C • 50 s/72 °C 	Matsuki in sod., 2002
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	Bac 303F Bac 708R	35 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 30 s/95 °C • 30 s/62 °C • 30 s/72 °C 	Bartosch in sod., 2004 Bernhard in Field, 2000
<i>Enterobacteriaceae</i>	Eco 1457f Eco 1652r	35 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 30 s/95 °C • 30 s/63 °C • 30 s/72 °C 	Bartosch in sod., 2004
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Fprau223F Fprau420R	40 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 30 s/95 °C • 30 s/58 °C • 30 s/72 °C 	Bartosch in sod., 2004 Wang in sod., 1996
<i>Enterococcus faecalis</i>	Efs130F Efs490R	50 ciklov: <ul style="list-style-type: none"> • 30 s/95 °C • 30 s/57 °C • 30 s/72 °C 	Meier in sod., 1997 Bartosch in sod., 2004

Nato smo v vsako od luknjic mikrotitrsko ploščo odpipetirali še 5 µl vzorca DNA v dveh paralelkah oz. standarda, pripravljenega, kot je opisano v poglavju 3.3.2.5. Na vsaki mikrotitrski plošči smo pustili vsaj dve luknjici, ki so vsebovale reagent, vendar niso vsebovali DNA standarda ali vzorca (NTC oziroma »No Template Control«). Namen NTC-ja je izločitev napake, ki bi se pojavila kot morebitna posledica kontaminacije tekom priprave na analizo PCR v realnem času.

All	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	Standard										
	SYBR	5.43e+010	1.81e+010	6.03e+009	2.01e+009	6.70e+008	2.23e+008	7.43e+007	2.48e+007	8.27e+006	2.76e+006	9.20e+005
B	Standard	NTC	NTC									
	76	77	78	79	80	69	70	71	72	73	SYBR	SYBR
	3.07e+005	1.02e+005	3.40e+004	1.13e+004	3.77e+003	6.70e+008	2.23e+008	7.43e+007	2.48e+007	8.27e+006		
C	Unknown											
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
	SYBR											
D	Unknown											
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
	SYBR											
E	Unknown											
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
	SYBR											
F	Unknown											
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
	SYBR											
G	Unknown											
	55	56	57	58	59	60	61	62	63			
	SYBR											

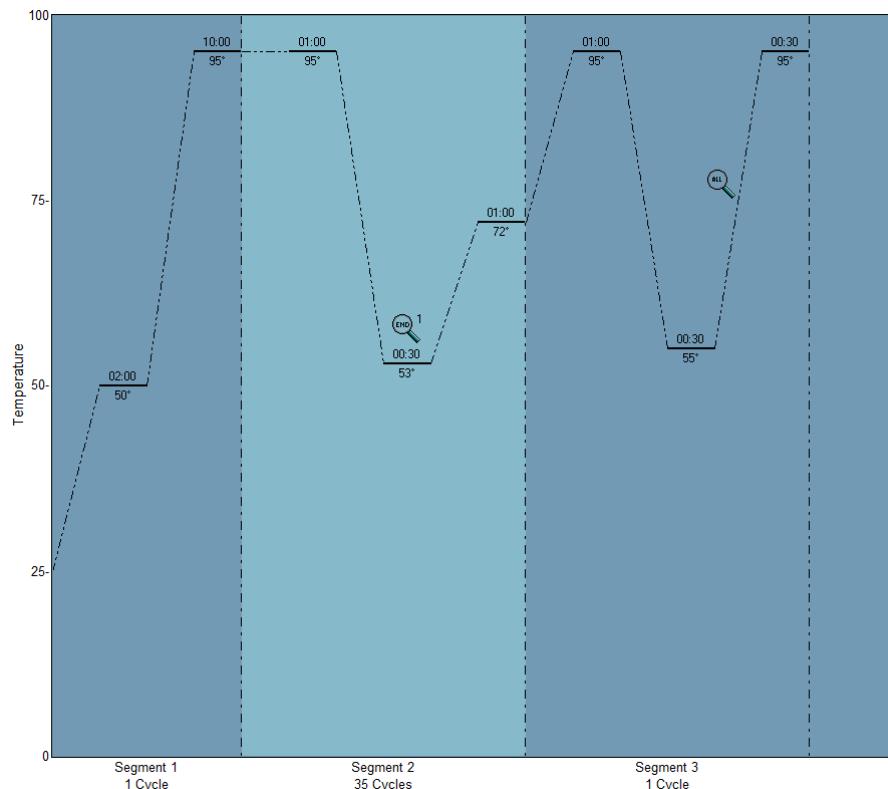
Slika 10: Primer razvrstitev vzorcev in standardov na mikrotitrski plošči, kot je predstavljena v programu MxPro. V tem primeru gre za analize PCR v realnem času za bakterijsko DNA vseh bakterij, izolirano iz vzorcev blata, ki so nosili laboratorijske oznake od 31 do 63. V vrsti A in B mikrotitrski plošče so razporejene zaporedne razredčitve standardnega vzorca DNA, z znanim izhodiščnim številom KE bakterij (vidno v spodnjem delu kvadratka) in reagenti brez dodane DNA (NTC), v vrstah C-G pa so postavljeni vzorci DNA, pridobljeno iz blata pacientov, vključenih v raziskavo.

Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo nato vstavili v aparat MX30000P (Stratagene, La Jolla, Calif.) in aktivirali program, primeren za obravnavano bakterijsko skupino. Programi so se med seboj razlikovali v številu ciklov in njihovem trajanju ter temperaturi. Vsak od programov je bil sestavljen iz treh faz: začetna faza, faza pomnoževanja (sestavljena iz 30-50 ciklov) s tremi temperaturnimi režimi: denaturacija (94-95 °C), prilaganje (57-63 °C) in podaljševanje (72 °C), ter zaključna faza. Začetna in zaključna faza sta bili enaki pri vseh analizah, in sicer:

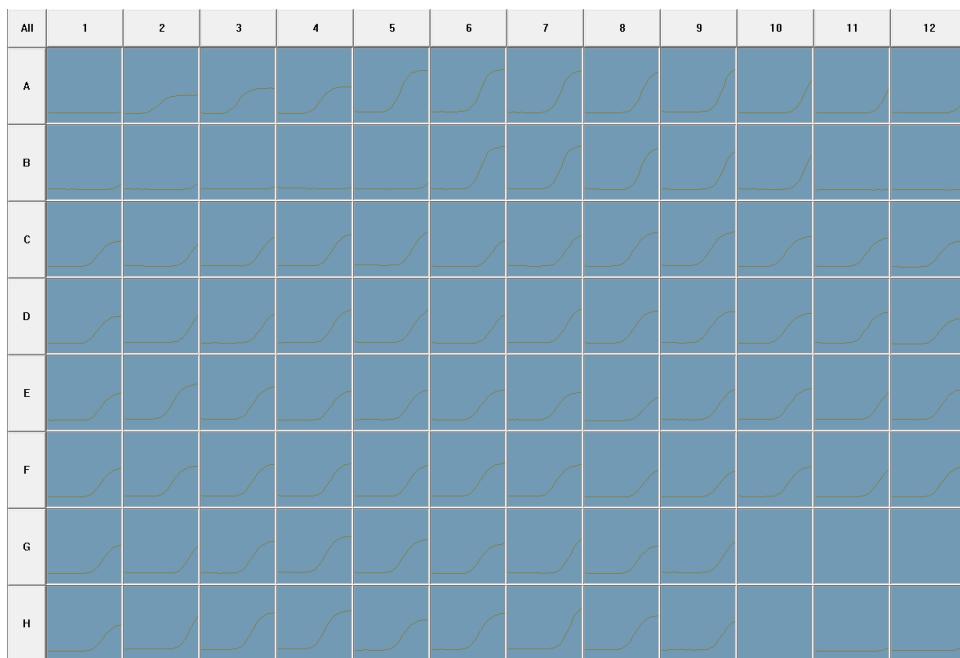
- začetna faza:
 - 2 minuti pri 50 °C,
 - 10 minut pri 95 °C,

- zaključna faza:
 - 60 sekund pri 95 °C,
 - 30 sekund pri 55 °C,
 - 30 sekund pri 95 °C.

Faze pomnoževanja za vsako od iskanih bakterijskih skupin so opisane v preglednici 3.



Slika 11: Primer poteka analize PCR v realnem času (temperaturni režimi), kot je predstavljena v programu MxPro. V tem primeru gre za analize PCR v realnem času za vse bakterije.



Slika 12: Primer poteka analize PCR v realnem času (zaznavanje fluorescence), kot je predstavljena v programu MxPro. V tem primeru gre za analize PCR v realnem času za bakterijsko DNA vseh bakterij, pridobljeno iz vzorcev blata, ki so nosili laboratorijsko oznako od 31 do 63 (kot predstavljene tudi na sliki 11). V vrsti A in B mikrotitrsko plošče so razporejeni standardni vzorci DNA, z znanim izhodiščnim številom KE bakterij (vidno v spodnjem delu kvadratka), v vrstah C-G pa so postavljeni vzorci DNA, pridobljeni iz blata pacientov, vključenih v raziskavo.

3.3.3 Statistična obdelava podatkov

Podatke, pridobljene s štetjem KE na ploščah in z analizo PCR v realnem času, smo obdelali s programoma Excel in SPSS.

S pomočjo programa Excel smo izračunali mediano, varianco in standardni odklon za rezultate štetja KE na ploščah, izražene kot število logaritmiranih vrednosti KE tarčnih skupin mikroorganizmov (rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, družine *Enterobacteriaceae*, vrste *Escherichia coli* oziroma koliformnih bakterij) na gram vzorca. Rezultate smo predstavili ločeno za skupino vzorcev blata pacientov s KVČB in skupino vzorcev blata pacientov s FMP (označeni kot »ostali«).

Za vsako skupino mikroorganizmov smo grafično predstavili tudi kvantitativno porazdelitev logaritmiranih vrednosti rezultatov štetja na ploščah za vzorce blata pacientov s KVČB in ostale paciente. Predstavili smo jo s pomočjo kvantitativnih diagramov, pri katerih okvir z ročaji prikazuje minimum (dno spodnjega ročaja), prvi kvartil, mediano (sredinska črta znotraj okvirja), tretji kvartil, maksimalno vrednost (vrh zgornjega ročaja) in morebitne osamelce (rdeče zvezdice za maksimum in vijolične zvezdice za minimum).

Na isti način smo ločeno za vzorce blata skupine pacientov s KVČB in ostalih pacientov (tistih s FMP) v Excel-u izračunali mediano, varianco ter standardni odklon za rezultate analize PCR v realnem času, izražene kot logaritmirano vrednost števila kopij *16S rDNA/g* vzorca ali število celic na gram blata pri *F. prausnitzii*. Za vsako skupino iskanih mikroorganizmov (vse bakterije, družina *Enterobacteriaceae*, rod *Bifidobacterium*, skupina *Bacteroides-Prevotella*, skupina *Clostridium leptum*, skupina *Clostridium coccoides*, *Faecalibacterium prausnitzii* oziroma *Enterococcus faecalis*) smo grafično s kvantilnim diagramom predstavili tudi kvantilno porazdelitev logaritmiranih vrednosti rezultatov analiz PCR v realnem času.

Za vsako od skupin vzorcev (KVČB in ostali) smo obravnavali smo tudi razmerje med številom kopij *16S rDNA* bakterij določene skupne (*Bifidobacterium*, *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, *Bacteroides-Prevotella*, *Enterobacteriaceae* oziroma *Enterococcus faecalis*) in številom kopij *16S rDNA* vseh bakterij. Razmerje smo izrazili kot %. Razmerje smo izračunali po sledeči formuli:

$$Razmerje_{vz} = \frac{\sum \text{število kopij } 16S \text{ rDNA/g}_{vzs}}{\sum \text{število kopij } 16S \text{ rDNA/g}_{vzz}} \times 100 \quad \dots(2)$$

Legenda:

Razmerje_{vz} ... iskano razmerje med določeno skupino in vsemi bakterijami za vsak posamezni vzorec, izraženo kot % kopij *16S rDNA* (krajše izraženo kot %)

\sum število kopij *16S rDNA/g* _{vzs}... število kopij *16S rDNA* bakterij določene skupine/g blata

\sum število kopij *16S rDNA/g* _{vzz}... skupni število kopij *16S rDNA* vseh bakterij/g blata

Izjema je bila edino pri *Faecalibacterium prausnitzii*, kjer rezultat analize ni bil izražen v številu kopij *16S rDNA*, temveč smo, kot je pojasnjeno v poglavju 3.3.2.5, rezultat dobili izražen kot število celic na g blata. Zato smo v tem primeru uporabili sledečo formulo:

$$Razmerje_{vzf} = \frac{\sum \text{število celic /g}_{vzf}}{\sum \text{število kopij } 16S \text{ rDNA/g}_{vzz}} \times 100 \quad \dots(3)$$

Legenda:

Razmerje_{vzf} ... iskano razmerje med bakterijami vrste *Faecalibacterium prausnitzii* in vsemi bakterijami za vsak posamezni vzorec, izraženo kot razmerje med celicami *Faecalibacterium prausnitzii* in številom kopij *16S rDNA* vseh bakterij (krajše kot izraženo kot % celic/kopije *16S rDNA* vseh bakterij)

\sum število kopij *16S rDNA/g* _{vzf}... število celic bakterij *Faecalibacterium prausnitzii/g* blata

\sum število kopij *16S rDNA/g* _{vzz}... skupni število kopij *16S rDNA* vseh bakterij/g blata

Tudi te rezultate smo analizirali z opisno statistiko, opisano v zgornjih odstavkih tega poglavja.

Za ugotavljanje značilnosti razlik med skupino otrok s KVČB in skupino otrok s FMP (»ostali«) smo uporabili program SPSS ter Wilcoxon-Mann-Whitney U test (neparametrični test), ki se uporablja za primerjave razlik med medianama dveh skupin vzorcev (Košmelj in Kastelec, 2002). Ničelna hipoteza trdi, da med medianama vzorcev ni razlik, in je ovržena, v kolikor je p vrednost, ki označuje statistično verjetnost, nižja od 0,05. Z Wilcoxon-Mann-Whitney U testom smo obravnavali rezultate obeh skupin vzorcev (KVČB in FMP oz. ostali), pridobljene tako s štetjem na ploščah kot tudi z analizo PCR v realnem času, in primerjavo rezultatov analize PCR v realnem času med posameznimi skupinami bakterij ter vsemi bakterijami.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI ŠTETJA KE NA PLOŠČAH

4.1.1 Opisna statistika rezultatov štetja KE na ploščah

4.1.1.1 Pregled rezultatov štetja na ploščah

Po opravljenem laboratorijskem delu smo statistično analizirali vse pridobljene rezultate, kot je to opisano v poglavju 3.3.3. Število vseh vzorcev vključenih v analizo, število neštevnih vzorcev in število vzorcev pod mejo detekcije, ter rezultati opisne statistične analize teh vzorcev (mediana, standardni odklon in varianca pri vsaki analizirani skupini), so prikazani v preglednici 4.

Preglednica 4: Statistični parametri rezultatov štetja različnih skupin bakterij v vzorcih blata otrok s KVČB in otrok s FMP (ostali).

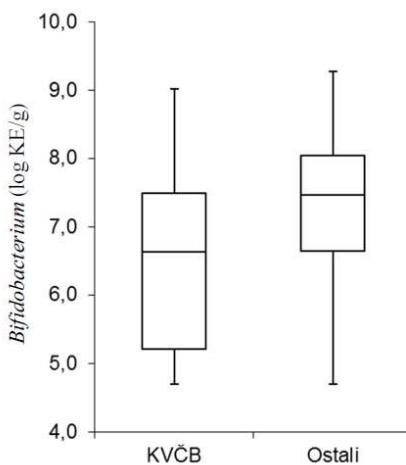
Preiskovane skupine bakterij	Skupina bolnikov	Število vseh vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Število neštevnih vzorcev	Mediana [log KE/g]	Standardni odklon [log KE/g]	Varianca [(log KE/g) ²]
<i>Bifidobacterium</i>	KVČB	29	7	0	6,64	1,39	1,92
	Ostali	29	2	0	7,46	1,13	1,27
<i>Lactobacillus</i>	KVČB	30	3	1	6,54	1,51	2,29
	Ostali	30	3	0	6,53	1,35	1,81
<i>Enterococcus</i>	KVČB	27	17	0	3,70*	1,45	2,09
	Ostali	24	18	1	3,70*	1,27	1,62
<i>Enterobacteriaceae</i>	KVČB	30	11	1	5,06	1,30	1,69
	Ostali	30	11	0	4,63	0,99	0,98
<i>Escherichia coli</i>	KVČB	30	10	1	4,35	1,21	1,47
	Ostali	30	15	1	3,80	1,31	1,72
Koliformne	KVČB	30	7	1	5,00	1,20	1,44
	Ostali	30	9	1	5,33	1,23	1,50
<i>Staphylococcus</i>	KVČB	30	22	2	3,70*	1,13	1,28
	Ostali	30	24	0	3,70*	0,67	0,45

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije.

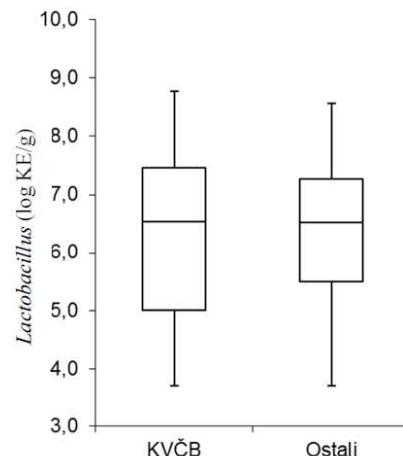
4.1.1.2 Grafična predstavitev rezultatov štetja na ploščah

Pridobljene logaritmirane rezultate štetja na gojitvenih ploščah smo predstavili v obliki kvantilnih diagramov. Na grafu okvir z ročaji prikazuje minimalno vrednost (dno spodnjega ročaja), prvi kvartil, mediano (sredinska črta znotraj okvirja), tretji kvartil, maksimalno vrednost (vrh zgornjega ročaja) in morebitne osamelce (rdeče zvezdice za maksimum in vijolične zvezdice za minimum). Kvantilni diagrami z rezultati štetja na

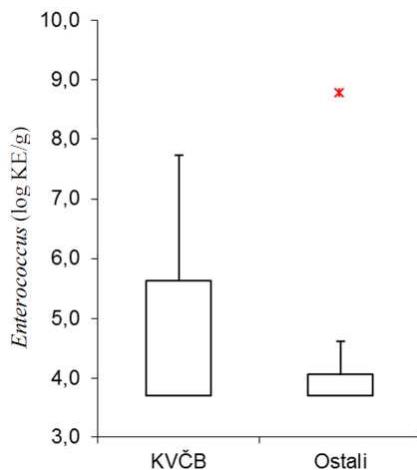
ploščah po posameznih tarčnih skupinah bakterij so prikazani na slikah 13-19, podatki o porazdelitvi kvartilov pa so podani v prilogi A1-A7.



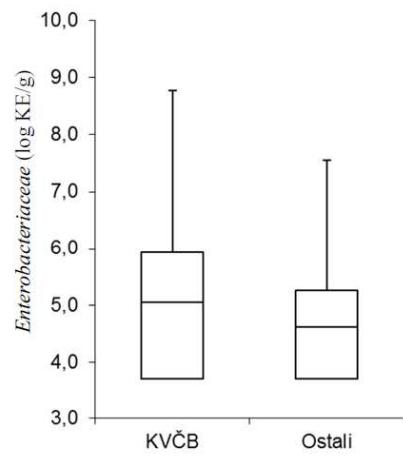
Slika 13: Število (log KE/g) bakterij rodu *Bifidobacterium* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



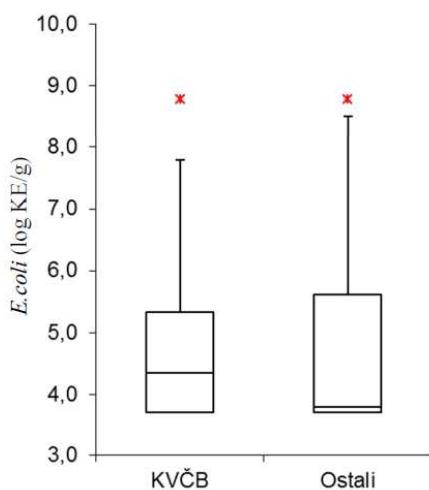
Slika 14: Število (log KE/g) bakterij rodu *Lactobacillus* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



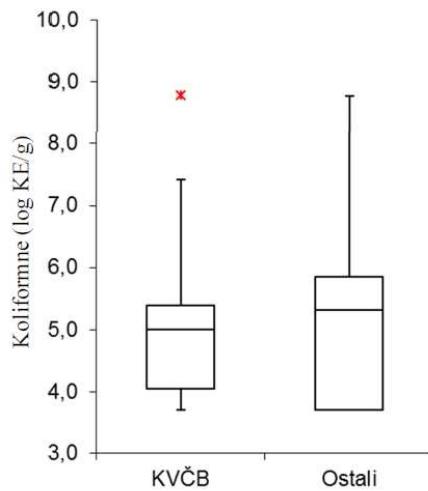
Slika 15: Število (log KE/g) bakterij rodu *Enterococcus* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



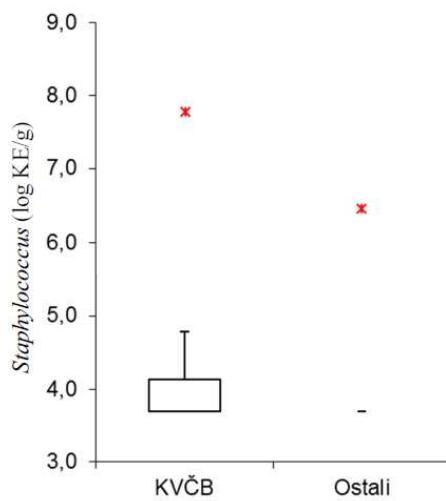
Slika 16: Število (log KE/g) bakterij družine *Enterobacteriaceae* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



Slika 17: Število (log KE/g) bakterij vrste *Escherichia coli* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



Slika 18: Število (log KE/g) koliformnih bakterij v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



Slika 19: Število (log KE/g) bakterij rodu *Staphylococcus* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.

4.1.2 Statistično testiranje rezultatov štetja na ploščah s testom Wilcoxon-Mann-Whitney

Poleg opisne statistične analize smo se lotili tudi primerjanja obeh skupin in iskanja statistično pomembnih razlik v prisotnosti določene mikrobiološke skupine oz. vrste med obema skupinama bolnikov. Rezultati statistične analize rezultatov štetja KE različnih skupin bakterij na ploščah, opravljene s pomočjo programa SPSS, so prikazani v preglednici 5. V četrtem stolpcu preglednice smo z znakom ** označili vse rezultate za

vrednost p, ki predstavljajo statistično pomembno razliko, torej tiste vrednosti, kjer je vrednost p nižja od 0,05.

Preglednica 5: Wilcoxon-Mann-Whitney U test - ugotavljanje razlik med skupino KVČB in FMP (ostali) za štetje na ploščah.

	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Statistična verjetnost (dvostranska)
<i>Bifidobacterium</i>	286,5	721,5	-2,088	0,037**
<i>Lactobacillus</i>	437,5	902,5	-0,185	0,853
<i>Enterococcus</i>	375	840	-1,322	0,186
<i>Enterobacteriaceae</i>	379,5	844,5	-1,069	0,285
<i>Escherichia coli</i>	430,5	895,5	-0,299	0,765
koliformne	421,5	886,5	-0,424	0,672
<i>Staphylococcus</i>	411	876	-0,778	0,437

** Statistično značilna razlika med skupinama KVČB in FMP ($p < 0,05$)

4.2 REZULTATI ANALIZE PCR V REALNEM ČASU

4.2.1 Opisna statistika rezultatov analiz PCR v realnem času

4.2.1.1 Pregled rezultatov analize PCR v realnem času

Na enak način kot smo obravnavali rezultate konvencionalnega štetja na ploščah, smo analizirali in primerjali tudi rezultate, pridobljene z analizo PCR v realnem času. Preglednici 6 in 7 prikazujeta podatke o številu vzorcev, vključenih v analizo, številu vzorcev z rezultati pod mejo detekcije ter rezultate opisne statistične analize teh vzorcev (mediana, standardni odklon in varianca pri vsaki bakterijski skupini). V preglednicah 8 in 9 pa so predstavljeni rezultati opisne statistike za razmerja med številom kopij tarčnih bakterijskih skupin in števila za vse bakterije, v tem primeru je rezultat izražen kot odstotek.

Preglednica 6: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času, za vsako od tarčnih bakterijskih skupin (vrste, rodovi, družine ali skupine sorodnih vrst).

Preiskovane skupine bakterij	Skupina bolnikov	Število vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Podatki o številu kopij 16S rDNA bakterijske skupine ali vrste		
				Mediana [log št. kopij/g]	Standardni odklon [log št. kopij/g]	Varianca [(log št. kopij/g) ²]
Vse bakterije	KVČB	30	0	12,16	0,65	0,42
	Ostali	30	0	12,52	0,62	0,39
<i>Bifidobacterium</i>	KVČB	30	0	9,13	1,02	1,05
	Ostali	30	0	9,85	0,88	0,78
<i>Clostridium leptum</i>	KVČB	30	8	8,91	1,31	1,71
	Ostali	30	3	10,29	1,4	1,96
<i>Clostridium coccoides</i>	KVČB	30	1	10,72	1,39	1,94
	Ostali	30	0	11,39	0,79	0,62
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	KVČB	30	8	10,69	1,05	1,11
	Ostali	30	5	10,85	1,04	1,07
<i>Enterobacteriaceae</i>	KVČB	30	1	9,48	1,48	2,18
	Ostali	30	2	8,31	1,42	2,02
<i>Enterococcus faecalis</i>	KVČB	30	9	4,33	2,16	4,66
	Ostali	30	14	2,3	1,93	3,71

Preglednica 7: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času za vrsto *F. prausnitzii*.

Preiskovane skupine bakterij	Skupina bolnikov	Število vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Podatki o številu celic <i>F. prausnitzii</i> v gramu blata otrok		
				Mediana [log št. celic/g]	Standardni odklon [log št. celic/g]	Varianca [(log št. celic/g) ²]
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	KVČB	30	0	10,17	1,32	1,73
	Ostali	30	0	10,59	0,65	0,43

Preglednica 8: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času, za razmerje med vsako izmed tarčnih bakterijskih skupin (vrste, rodovi, družine ali skupine sorodnih vrst) in vsemi bakterijami.

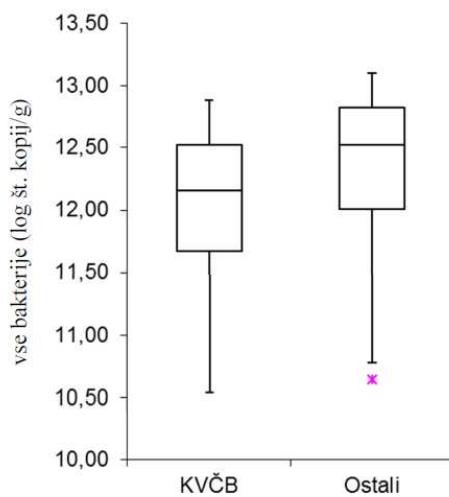
Preiskovane skupine bakterij	Skupina bolnikov	Število vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Podatki o razmerju med številom kopij <i>16S rDNA</i> bakterijske skupine ali vrste in številom kopij <i>16S rDNA</i> vseh bakterij		
				Mediana [%]	Standardni odklon [%]	Varianca [% ²]
<i>Bifidobacterium</i>	KVČB	30	0	0.14	0.27	0.08
	Ostali	30	0	0.17	0.35	0.12
<i>Clostridium leptum</i>	KVČB	30	8	0.14	4	16.01
	Ostali	30	3	0.44	3.28	10.76
<i>Clostridium coccoides</i>	KVČB	30	1	3.54	3.48	12.09
	Ostali	30	0	5.64	2.62	6.85
<i>Bacteroides-Prevotella</i>	KVČB	30	8	3.18	7.79	60.64
	Ostali	30	5	2.11	5.1	25.98
<i>Enterobacteriaceae</i>	KVČB	30	1	0.37	3.01	9.09
	Ostali	30	2	0.01	3.09	9.57
<i>Enterococcus faecalis</i>	KVČB	30	9	$1,90 \times 10^{-6}$	$3,34 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^{-5}$
	Ostali	30	14	$1,40 \times 10^{-8}$	$3,84 \times 10^{-3}$	$1,47 \times 10^{-5}$

Preglednica 9: Statistični parametri, izračunani iz rezultatov analize vzorcev blata otrok s PCR v realnem času, za razmerje med *F. prausnitzii* in vsemi bakterijami.

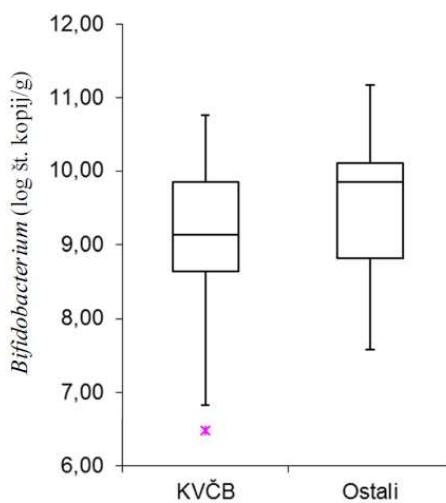
Preiskovane skupine bakterij	Skupina bolnikov	Število vzorcev	Število vzorcev pod mejo detekcije	Podatki o razmerju med številu kopij celic <i>F. prausnitzii</i> in številom kopij gena <i>16S rDNA</i> vseh bakterij		
				Mediana [% celic/kopije <i>16S rDNA</i> vseh bakterij]	Standardni odklon [% celic/kopije <i>16S rDNA</i> vseh bakterij]	Varianca [(% celic/kopije <i>16S rDNA</i> vseh bakterij) ²]
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	KVČB	30	0	0.77	8.86	78.44
	Ostali	30	0	1.42	0.87	0.76

4.2.1.2 Grafična predstavitev rezultatov analize PCR v realnem času

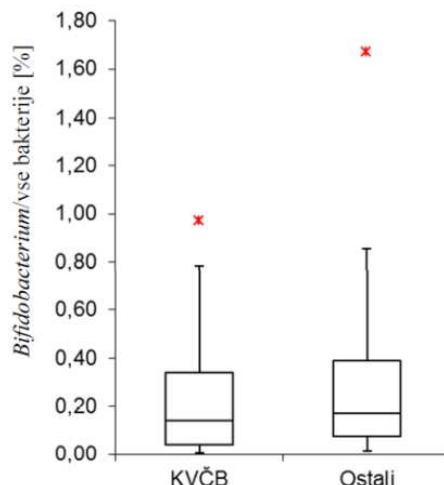
Pridobljene logaritmirane rezultate štetja na ploščah smo predstavili tudi s pomočjo kvantilnih diagramov. Na grafu okvir z ročaji prikazuje minimalno vrednost (dno spodnjega ročaja), prvi kvartil, mediano (sredinska črta znotraj okvirja), tretji kvartil, maksimalno vrednost (vrh zgornjega ročaja) in morebitne osamelce (rdeče zvezdice za maksimum in vijolične zvezdice za minimum). Kvantilni diagrami po iskanih skupinah bakterij s štetjem na ploščah so prikazani na slikah 20-34, točni podatki o porazdelitvi kvartilov pa so podani v prilogi B1-B15.



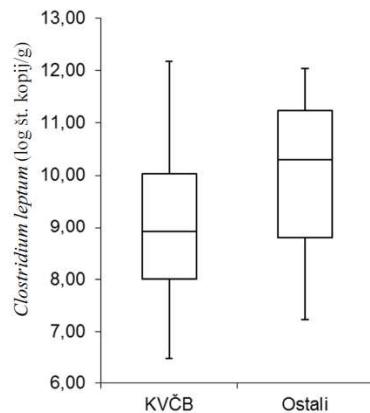
Slika 20: Prisotnost vseh bakterij v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij *16S rDNA* v g blata.



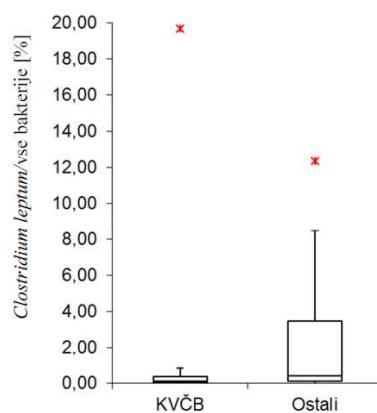
Slika 21: Prisotnost rodu *Bifidobacterium* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiziranih vrednosti števila kopij 16S rDNA v g blata.



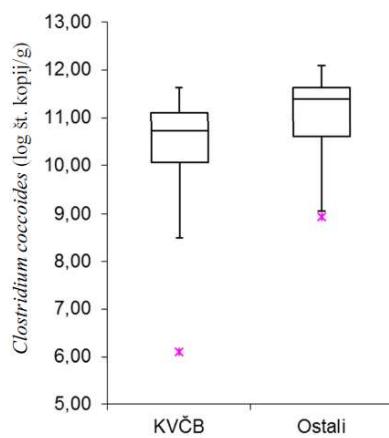
Slika 22: Razmerje med številom kopij 16S rDNA rodu *Bifidobacterium* in številom kopij 16S rDNA vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



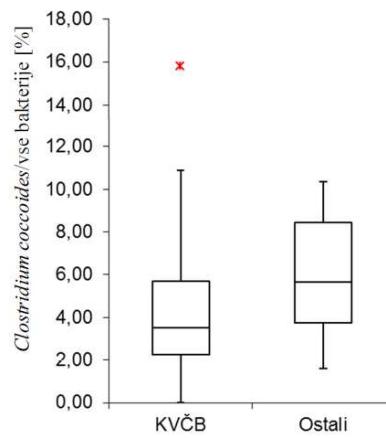
Slika 23: Prisotnost skupine *Clostridium leptum* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiziranih vrednosti števila kopij 16S rDNA v g blata.



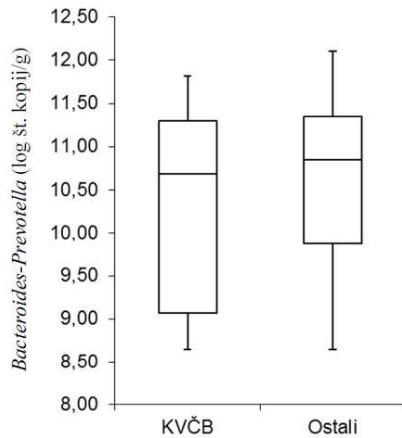
Slika 24: Razmerje med številom kopij 16S rDNA skupine *Clostridium leptum* in številom kopij 16S rDNA vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



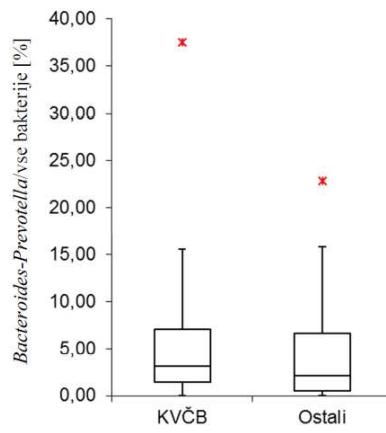
Slika 25: Prisotnost skupine *Clostridium coccoides* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij *16S rDNA* v g blata.



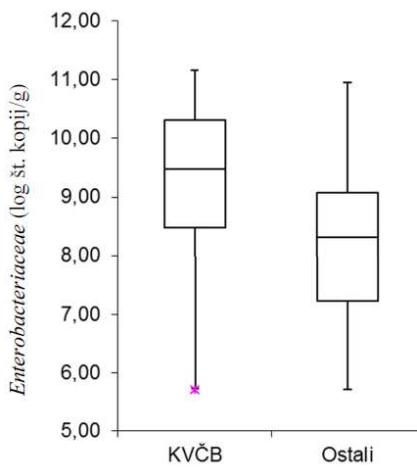
Slika 26: Razmerje med številom kopij *16S rDNA* skupine *Clostridium coccoides* in številom kopij *16S rDNA* vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



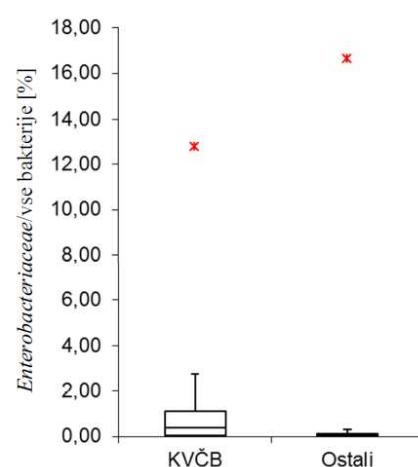
Slika 27: Prisotnost bakterij skupine *Bacteroides-Prevotella* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij *16S rDNA* v g blata.



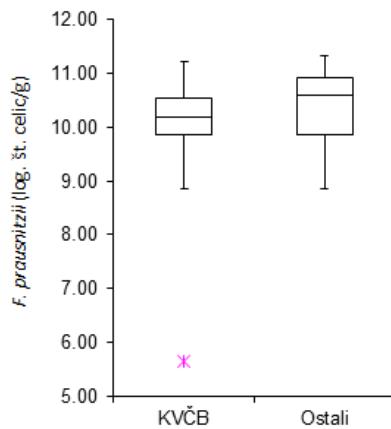
Slika 28: Razmerje med številom kopij *16S rDNA* skupine *Bacteroides-Prevotella* in številom kopij *16S rDNA* vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



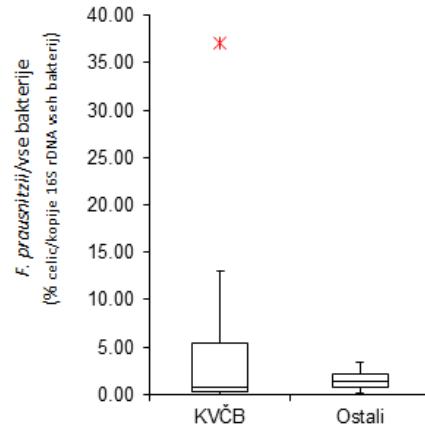
Slika 29: Prisotnost družine *Enterobacteriaceae* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiziranih vrednosti števila kopij *16S rDNA* v g blata.



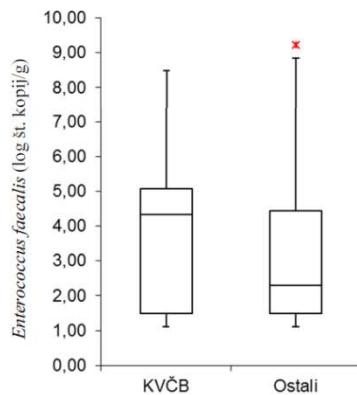
Slika 30: Razmerje med številom kopij 16S rDNA družine *Enterobacteriaceae* in številom kopij 16S rDNA vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



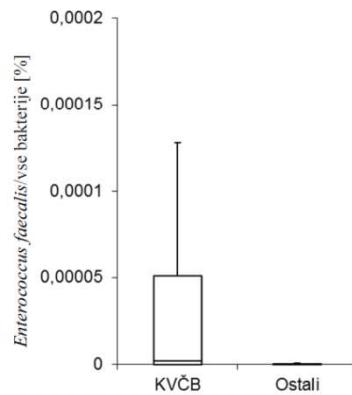
Slika 31: Prisotnost vrste *Faecalibacterium prausnitzii* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiziranih vrednosti števila celic v gramu blata.



Slika 32: Razmerje med številom celic vrste *Faecalibacterium prausnitzii* in številom kopij 16S rDNA vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram.



Slika 33: Prisotnost vrste *Enterococcus faecalis* v blatu otrok s KVČB in blatu otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram logaritmiranih vrednosti števila kopij *16S rDNA* v gramu blata.



Slika 34: Razmerje med številom kopij *16S rDNA* *Enterococcus faecalis* in številom kopij *16S rDNA* vseh bakterij v blatu otrok s KVČB ter otrok s FMP (ostali) - kvantilni diagram. Osamelci so bili zaradi boljše preglednosti odstranjeni.

4.2.2 Statistično testiranje rezultatov analiz PCR v realnem času s testom Wilcoxon-Mann-Whitney

Enako kot pri analizi s štetjem KE, smo se tudi pri analizi s PCR v realnem času lotili primerjanja obeh skupin in iskanja statistično pomembnih razlik v prisotnosti določene skupine bakterij oz. vrste med obema skupinama bolnikov. Rezultati neparametričnih statističnih analiz, pridobljeni s pomočjo programa SPSS, so prikazani v dveh preglednicah. V preglednici 10 so predstavljeni rezultati, kjer smo primerjali število kopij *16S rDNA* za vsako bakterijsko vrsto/skupino med obema skupinama bolnikov (otroci s KVČB in otroci s FMP). V preglednici 11 pa so predstavljeni rezultati statistične analize primerjave obeh skupin bolnikov, vendar gre v tem primeru za razmerja med številom kopij gena *16S rDNA* vsake od iskane skupine oziroma vrste bakterij in številom kopij gena *16S rDNA* vseh bakterij, razen v primeru *Faecalibacterium prausnitzii*, kjer so pridobljeni podatki izraženi kot število celic/g blata, oz. kot razmerje med številom celic te bakterije in številom kopij gena *16S rDNA* za vse bakterije. V četrtem stolpcu preglednic smo z znakom ** označili vse rezultate za vrednost p, ki predstavljajo statistično pomembno razliko, torej tiste vrednosti, kjer je vrednost p nižja od 0,05.

Preglednica 10: Rezultati statistične analize razlik med skupinama KVČB in FMP v rezultatih kvantifikacije različnih skupin bakterij v blatu (št. kopij *16S rDNA*) z analizo PCR v realnem času. Uporabili smo Wilcoxon-Mann-Whitney U test.

	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Statistična verjetnost (dvostranska)
Vse bakterije (št. kopij/g)	292	757	-2,336	0,019**
<i>Bifidobacterium</i> (št. kopij/g)	327	792	-1,818	0,069
<i>Clostridium leptum</i> (št. kopij/g)	297,5	762,5	-2,26	0,024**
<i>Clostridium coccoides</i> (št. kopij/g)	263	728	-2,765	0,006**
<i>Bacteroides-Prevotella</i> (št. kopij/g)	419	884	-0,459	0,646
<i>Enterobacteriaceae</i> (št. kopij/g)	301	766	-2,203	0,028**
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> (št. celic/g)	305	770	-2,144	0,032**
<i>Enterococcus faecalis</i> (št. kopij/g)	317	782	-1,982	0,047**

** Oznaka za značilno razliko med skupinama KVČB in FMP ($p < 0,05$)

Preglednica 11: Rezultati statistične analize razlik med skupinama KVČB in FMP v rezultatih kvantifikacije različnih skupin bakterij v blatu (razmerje med št. kopij *16S rDNA* posameznih skupin, oziroma v primeru *Faecalibacterium prausnitzii* razmerje med številom celic in št. kopij *16S rDNA* za vse bakterije) z analizo PCR v realnem času. Uporabili smo Wilcoxon-Mann-Whitney U test.

	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Statistična verjetnost (dvostranska)
<i>Bifidobacterium/</i> vse bakterije	402	867	-0,71	0,478
<i>Clostridium leptum/</i> vse bakterije	318	783	-1,952	0,051
<i>Clostridium coccoides/</i> vse bakterije	293	758	-2,321	0,020**
<i>Bacteroides-Prevotella/</i> vse bakterije	382	847	-1,005	0,315
<i>Enterobacteriaceae/</i> vse bakterije	244	709	-3,046	0,002**
<i>Faecalibacterium prausnitzii/</i> vse bakterije	448	913	-0,03	0,976
<i>Enterococcus faecalis/</i> vse bakterije	290	755	-2,366	0,018**

** Oznaka za značilno razliko med skupinama KVČB in FMP ($p < 0,05$)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naloge je bil raziskati mikrobioto blata otrok s KVČB in FMP, in poiskati morebitne razlike v sestavi mikrobiote med obema skupinama pacientov, ki se zdravijo na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana. V študijo je bilo vključenih 30 otrok s KVČB in 30 otrok s FMP s simptomi, ki se kažejo na področju črevesa.

Za ugotavljanje razlik v sestavi mikrobiote v blatu otrok, obolelih s KVČB in ostalimi otroci (s FMP) smo najprej uporabili metodo štetja KE na ploščah, za kar smo uporabili 6 različnih gojišč in pridobili kvantitativne podatke o prisotnosti 5 različnih bakterijskih skupin (rod *Bifidobacterium*, rod *Lactobacillus*, rod *Enterococcus*, rod *Staphylococcus* in družina *Enterobacteriaceae*), vrste *E. coli*, ter številu koliformnih bakterij v gramu blata.

Na podlagi podatkov štetja na ploščah smo opazili, da so bile tako pri otrocih, obolelih s KVČB, kot tistih, ki so oboleli za FMP, od preiskovanih skupin mikroorganizmov v tem delu po metodi štetja na ploščah najbolj številčne bakterije rodu *Bifidobacterium* (pri skupini KVČB med 4,70 log KE/g blata in 9,03 log KE/g blata; pri skupini FMP med 4,70 log KE/g blata in 9,28 log KE/g blata) in *Lactobacillus* (pri skupini KVČB med 3,70 log KE/g blata in 8,78 log KE/g blata; pri skupini FMP med 3,70 log KE/g blata in 8,56 log KE/g blata). Najmanj številčne so bile bakterije rodu *Enterococcus* (pri skupini KVČB med 3,70 log KE/g blata in 7,74 log KE/g blata; pri skupini FMP med 3,70 log KE/g blata in 8,78 log KE/g blata) in *Staphylococcus* (pri skupini KVČB med 3,70 log KE/g blata in 7,78 log KE/g blata; pri skupini FMP med 3,70 log KE/g blata in 6,46 log KE/g blata), ki pogosto na selektivnem agarju niso zrasle, ter smo jim v teh primerih pripisali vrednost, ki je bila polovico manjša od meje detekcije (v teh primerih je to 3,70 log KE/g blata).

Zatem smo mikrobioto v blatu preiskali še z metodo PCR v realnem času, kjer smo s pomočjo pomnoževanja različnih delov gena za 16S rRNA celokupne bakterijske DNA iz vzorcev blata pridobili rezultat o številu kopij *16S rDNA* za vse bakterije, za pet bakterijskih skupin (družina *Enterobacteriaceae*, rod *Bifidobacterium*, skupina *Bacteroides-Prevotella*, skupina *Clostridium leptum* in skupina *Clostridium coccoides*) in za dve bakterijski vrsti (*Faecalibacterium prausnitzii* in *Enterococcus faecalis*). Od preiskovanih mikroorganizmov so bile pri obeh skupinah otrok, sodeč po rezultatih o številu kopij *16S rDNA* v gramu blata, najbolj zastopane bakterije iz skupine *Clostridium coccoides* (pri skupini KVČB med 6,10 log št. kopij/g blata in 11,62 log št. kopij/g blata; pri skupini FMP med 8,93 log št. kopij/g blata in 12,09 log št. kopij/g blata). To je skupina, ki obsega večje število bakterijskih vrst in spada med eno od najbolj zastopanih bakterijskih skupin človeške črevesne mikrobiote (Mariat in sod., 2009). Najmanj številčna je bila bakterijska vrsta *Enterococcus faecalis* (pri skupini KVČB med 1,11 log št. kopij/g blata in 8,49 log št. kopij/g blata; pri skupini FMP med 1,11 log št. kopij/g blata in 9,22 log

št. kopij/g blata). Rezultat za bakterijsko vrsto *F. prausnitzii* je bil izražen, za razliko od drugih skupin, kot število celic/g blata, kar je posledica odsotnosti podatka o številu kopij gena za 16S rRNA pri tej skupini v bazi *rrnDB* (več o tem v poglavju 3.3.2).

Ko je bilo laboratorijsko delo opravljeno, smo rezultate razdelili glede na skupine bolnikov in jih statistično analizirali s pomočjo Wilcoxon-Mann-Whitney U testa, s katerim se ugotavlja statistična pomembnost razlike med dvema skupinama vzorcev (razlika med skupinama se upošteva kot značilna, kadar je vrednost p manjša od 0,05). Pri štetju na ploščah smo dobili le eno statistično značilno razliko, in sicer pri bakterijah rodu *Bifidobacterium* ($p=0,037$), ki so bile v večjem številu prisotne pri otrocih in mladostnikih s FMP.

Bifidobakterije spadajo med najbolj pogoste bakterijske rodove, ki se nahajajo v človeški črevesni mikrobioti, in imajo pomembno vlogo v zdravemu človeškemu črevesju. Spadajo med saharolitične bakterije (hidrolizirajo ogljikove hidrate) in so sposobne izkoriščati sicer neprebavljive vlaknine, pri čemer proizvajajo za človeka koristne metabolite (Prakash in sod., 2011). Bifidobakterije, prav tako kot predstavnice *Lactobacillus*, pogosto nastopajo kot probiotiki, ki jih uživamo z namenom izboljšanja črevesne mikrobiote. Probiotiki so žive kulture mikroorganizmov, ki jih zaužijemo oralno, tako da pridejo v črevesje, kjer dobrobitno vplivajo na razvoj in stabilnost črevesne mikrobiote ter spodbujajo njene koristne funkcije, obenem pa otežujejo kolonizacijo patogenih mikroorganizmov (Tlaskalová-Hogenová in sod., 2004). Raziskave, opravljene na obolelih s KVČB, še niso ponudile jasnih in skladnih odgovorov o učinkovitosti terapije s trenutno poznanimi probiotiki (Van Immerseel in sod., 2010). Pri otrocih s FMP, še posebej tistimi s SRČ, pa pogosteje opažajo, da ima uporaba probiotikov pozitiven vpliv, pri čemer so izjema pacienti s kroničnim zaprtjem, pri katerih pozitivnega vpliva probiotikov niso potrdili (Korterink in sod., 2014).

V rodu bifidobakterij ne najdemo patogenih mikroorganizmov, zato veljajo za varne za uporabo v prehrani ljudi (Picard in sod., 2005). V številnih raziskavah so analizirali prisotnost predstavnic te vrste tako pri bolnikih s KČVB kot tudi pri bolnikih s FMP, s hipotezo, da je v blatu pacientov manj bifidobakterij v primerjavi z zdravimi ljudmi. V nekaterih od teh študij, v katerih so primerjali številčnost bifidobakterij v blatu, so odkrili razlike med obolelimi s KVČB, kot tudi obolelimi s FMP, in zdravimi osebki, in zaključili, da je prisotnost bifidobakterij v mikrobioti blata posameznikov s temi oblikami obolenj manjša kot v blatu zdravih ljudi (Takaishi in sod., 2007; Sha in sod., 2012; Shukla in sod., 2015). Druge študije pa so dale drugačne rezultate, zato še ni jasno ali je smiselno povezovati razlike v številčnosti bifidobakterij v blatu posameznikov z omenjenimi obolenji (Malinen in sod., 2005; Sokol in sod., 2006; Tana in sod., 2010; Wang in sod., 2014).

Rezultati, pridobljeni v naši raziskavi, potrjujejo hipotezo, da razlika med številčnostjo bifidobakterij v mikrobioti blata otrok s KVČB in otrok s FMP najverjetneje obstaja. Ne moremo pa izključiti, da se mikrobiota otrok brez KVČB (tistih s FMP) iz naše raziskave ne razlikuje od mikrobiote zdravih otrok, saj tudi otroci brez KVČB niso bili popolnoma zdravi, ampak so poiskali zdravniško pomoč zaradi prebavnih težav. Ker so raziskave, prikazane v tej nalogi, del širše raziskave, v kateri so pridobili in analizirali biopsijske vzorce črevesne sluznice otrok s sumom na KVČB, zdravih otrok v raziskavo niso vključevali, saj zaradi etičnih razlogov zdravih otrok ne izpostavljam invazivnemu posegu odvzemanja vzorcev črevesne sluznice.

Bistveno več statistično značilnih razlik smo opazili pri rezultatih analiz mikrobiote blata s PCR v realnem času, in sicer so se značilne razlike pokazala v številčnosti vseh bakterij, kot tudi pri v številčnosti in/ali deležu skupin *Clostridium leptum*, *Clostridium coccoides*, družine *Enterobacteriaceae*, ter vrst *Faecalibacterium prausnitzii* in *Enterococcus faecalis*. Statistično značilnih razlik ni bilo pri skupini *Bacteroides-Prevotella* ($p=0,646$ za število kopij in $p=0,315$ za razmerje (%) glede na vse bakterije) in bakterijah rodu *Bifidobacterium* ($p=0,069$ za število kopij in $p=0,478$ za razmerje (%) glede na vse bakterije). Vendar pa je bila v primeru bifidobakterij številčnost le teh ($p=0,069$) blizu same meje značilnosti, kot smo jo postavili v tem delu ($p=0,05$).

Tako so se nam rezultati glede bifidobakterij pri obeh metodah nekoliko razlikovali, saj smo pri metodi štetja na ploščah razliko med skupinama potrdili, pri metodi PCR v realnem času pa ta razlika ni bila potrjena (bila pa je blizu same meje značilnosti). Razlike med rezultati metod nas ne presenečajo, saj metodi ne zajameta istega dela bakterijske populacije bifidobakterij. Namreč, medtem ko kultivacijska metoda s štetjem na ploščah zazna samo tiste bakterije, ki so še vedno žive in sposobne razmnoževanja oziroma tvorbe kolonij na gojišču, z drugo besedo kultivabilne bakterije, pa analiza z PCR v realnem času temelji na zaznavanju DNA, ki pa ne izhaja le iz kultivabilnih bakterij, ampak vseh, vključno z neživimi.

Iz naših rezultatov je razvidno, da je bila količina vseh bakterij statistično značilno manjša pri bolnikih s KVČB kot pri bolnikih s FMP ($p=0,019$). Pri tem pa je potrebno upoštevati, da ne moremo govoriti o številu bakterij ali KE, saj so rezultati analize PCR v realnem času izraženi kot število kopij *16S rDNA*. Števila kopij *16S rDNA* ni mogoče enostavno preračunati v število celic, saj imajo različne vrste bakterij v genomu različno število kopij tega gena. Pri izražanju podatkov za rodove, družine ali skupine uporabimo povprečno število kopij. Ta podatek je mogoče najti v ustreznih podatkovnih bazah. Kljub temu, da ti rezultati niso absolutni, pa omogočajo primerjavo številčnosti ali deleža določene bakterijske vrste ali skupine med preiskovanimi pacienti, saj je število kopij *16S rDNA* neposredno odvisno od števila bakterijskih celic, živih ali mrtvih, ki se nahajajo v analiziranem blatu.

Pri bolnikih s KVČB je sluznica črevesja bistveno bolj poškodovana, vnetje pa drastično prizadene črevesje in spremeni splošno homeostazo, kar bi lahko vplivalo na številčnost bakterij v blatu bolnikov. Več študij opisuje zmanjšanje števila bakterij pri bolnikih s KVČB, še posebej bakterijskih vrst, ki so povezane z zdravo mikrobioto in delujejo v dobrobit človeka (Kabeerdoss in sod., 2013; Kang in sod., 2010; Sha in sod., 2012; Sokol in sod., 2006; Takaishi in sod., 2007; Wang in sod., 2014), njihova manjša številčnost pa bi lahko vplivala tudi na manjše skupno število vseh bakterij pri otrocih obolelih s KVČB (Sokol in sod., 2006). Obenem pa je pri otrocih s KVČB eden od poglavitnih simptomov driska, kar ni nujno v primeru otrok s FMP, to pa lahko vpliva na število mikroorganizmov na gram blata zaradi večje prisotnosti vode v blatu in večjega volumna le tega. Te razlike v teksturi blata, vključenega v analizo, smo med pripravo vzorcev dejansko opazili. Iz tega vidika je pomembno tudi razmerje (%) med iskano bakterijsko skupino ali vrsto v blatu in vsemi zaznanimi bakterijami v blatu. To razmerje smo v tem delu tudi izračunali, prikazali in statistično ovrednotili, ter tudi tu v veliko primerih zaznali statistično pomembne razlike med obema skupinama otrok.

Skupini *Clostridium coccoides* in *Clostridium leptum* sta dve od štirih najbolj dominantnih skupin bakterij v človeškem blatu (Mariat in sod., 2009). Bakterije iz skupin *Clostridium* imajo številne in različne vloge, avtorji pa tudi navajajo, da so močno vpletene pri procesu vzdrževanja splošne funkcije črevesja, saj sodelujejo v uravnavanju fizioloških, metabolnih in imunskeh procesov. Pomembno je tudi dejstvo, da se jih pogosto omenja kot mikroorganizme, ki s svojo prisotnostjo ščitijo pred vnetjem, njihova pomanjšana koncentracija v črevesni mikrobioti pa se pogosto opazi pri bolnikih s KVČB. Razlogi za to še niso popolnoma pojasnjeni, sklepajo pa, da so pomembni pri vnetnih procesih in za vzdrževanje homeostaze (Lopetuso in sod., 2013).

Skupini *C. coccoides* in *C. leptum* trenutno veljata za najbolj pomembni skupini bakterij v smislu proizvodnje kratko verižnih maščobnih kislin, zlasti butirata, medtem ko vrsta *Faecalibacterium prausnitzii*, pomembna predstavnica skupine *C. leptum*, predstavlja eno od najbolj številčno zastopanih vrst bakterij, ki proizvajajo butirat v človeškem črevesju (Hold in sod., 2003). Butirat in ostale kratkoverižne maščobne kisline so pomembne snovi, ki se sintetizirajo preko bakterijske fermentacije ogljikovih hidratov v črevesju. Predstavljajo pomemben člen procesa ohranjanja homeostaze človeške črevesne mikrobiote in optimalne funkcije človeških prebavil (Scheppach, 1994). Butirat je namreč predosten vir energije za črevesne epitelijalne celice, obenem pa obstajajo tudi dokazi, da pomaga okrepiti obrambno bariero črevesja, vpliva na delovanje imunskega sistema in uravnava rast celic in tkiva (Prakash in sod., 2011).

Zaradi pomembne vloge butirata v črevesju številni avtorji povezujejo prisotnost kratkoverižnih maščobnih kislin in bakterij, ki le te sintetizirajo, s pojavom, potekom in lajšanjem vnetja v črevesju in s tem povezanimi boleznimi (Goldsmith in Sartor, 2014;

Scheppach, 1994; Vinolo in sod., 2011). *F. prausnitzii* in nekateri drugi mikroorganizmi, ki so sposobni sinteze butirata, predvsem bakterije iz skupine *C. coccoides* in *C. leptum*, so tudi obetavni probiotični kandidati za uporabo pri bolnikih s KVČB, vendar je na tem področju potrebno opraviti še več raziskav, ki bodo prispevale k boljšemu razumevanju vloge teh organizmov (Van Immerseel in sod., 2010).

Več avtorjev se je pri raziskavah mikrobiote usmerilo prav na skupini *C. coccoides* in *C. leptum*, ter bolj specifično na bakterijsko vrsto *F. prausnitzii*. Značilne razlike med mikrobioto v blatu obolelih in zdravih posameznikov so se v mnogih primerih dejansko pokazale, običajno v manjši prisotnosti teh skupin pri obolelih za KVČB (Kabeerdoss in sod., 2013; Kang in sod., 2010; Sokol in sod., 2006; Takaishi in sod., 2007; Wang in sod., 2014). Nekaj avtorjev je poročalo o manjši prisotnosti omenjenih bakterijskih skupin tudi pri obolelih s FMP (Malinen in sod., 2005; Carroll in sod., 2012), vendar so bili tu rezultati raziskav nekoliko manj dosledni (Malinen in sod., 2005; Shukla in sod., 2015; Tana in sod., 2010).

Ko smo v našem delu s pomočjo PCR v realnem času primerjali mikrobioto blata obeh skupin, smo pri *C. coccoides*, *C. leptum*, in *F. prausnitzii* opazili razlike med skupinama, ki so se kazale kot manjša zastopanost bakterij v blatu obolelih s KVČB kot pri tistih s FMP. Razlika je bila statistično značilna tako pri številu kopij *16S rDNA* za vsako od skupin ($p=0,006$ za *C. coccoides*, $p=0,024$ za *C. leptum*, in $p=0,032$ za *F. prausnitzii*), kot pri razmerju (%) tega števila s številom kopij *16S rDNA* za vse bakterije ($p=0,02$ za *C. coccoides* in $p=0,051$ za *C. leptum*), z izjemo pri razmerju med *F. prausnitzii* in vsemi bakterijami, kjer razlika ni bila značilna ($p=0,976$).

Enterobacteriaceae je družina, ki vključuje tako simbiotske bakterije kakor tudi tiste, ki so znani patogeni, kot so predstavniki rodu *Salmonella* in vrste *Escherichia coli*. Povečanje števila bakterij iz te družine v črevesni mikrobioti v literaturi povezujejo z začetnimi fazami vnetja v črevesju (Garrett in sod., 2010) in infekcijami, ki lahko vodijo v nastanek FMP (Carroll in sod., 2012), čeprav nekatere raziskave niso pokazale značilnih razlik v prisotnosti enterobakterij v blatu obolelih ljudi s KVČB (Takaishi in sod., 2007; Sokol in sod., 2006) ali FMP (Tana in sod., 2010) in zdravimi kontrolnimi skupinami. Carroll in sod. (2012) so v študiji na populaciji oseb s SRČ z drisko ugotovili večjo prisotnost bakterij družine *Enterobacteriaceae* pri obolelih v primerjavi z zdravo kontrolo, kar kaže na to, da je smiselno raziskave usmeriti bolj ciljano na točno določene oblike bolezni oz. obolele s prevladujočimi točno določenimi simptomi.

V naši študiji smo na podlagi analize PCR v realnem času ugotovili večjo prisotnost bakterij družine *Enterobacteriaceae* pri otrocih s KVČB kot pri FMP skupini, tako pri samem številu kopij *16S rDNA* ($p=0,028$), kot pri razmerju (%) le tega glede na število kopij gena vseh bakterij ($p=0,002$), čeprav se je tudi v tem primeru rezultat razlikoval od

tistega, dobljenega z metodo štetja na ploščah, kjer razlika med številčnostjo bakterij v blatu ni bila statistično pomembna ($p=0,285$).

Podobno smo opazili tudi pri rezultatih za vrsto *Enterococcus faecalis*. Med predstavniki te vrste sicer najdemo tudi veliko patogenih sevov, ki so vpleteni v infekcije pri ljudeh oziroma so oportunistični bolnišnični patogeni (Megran, 1992). Raziskave na miših nakazujejo, da kolonizacija s to vrsto lahko vodi v nastanek vnetnih črevesnih bolezni (Balish in Warner, 2002).

V našem delu smo v skladu z našimi pričakovanji zaznali večjo prisotnost vrste *E. faecalis* v blatu otrok s KVČB, kot pri otrocih s FMP ($p=0,047$). Statistično pomembna razlika pa je bila tudi v samem razmerju (%) tega organizma v vzorcih blata glede na vse bakterije ($p=0,018$).

5.2 SKLEPI

- Na podlagi štetja KE na ploščah smo ugotovili, da so bile v blatu otrok, obolelih s KVČB, kot tudi otrok s FMP, številčno bolj zastopane bakterije rodov *Bifidobacterium* in *Lactobacillus*, manj pa bakterije rodov *Enterococcus* in *Staphylococcus*.
- Na podlagi rezultatov PCR v realnem času smo ugotovili, da je bila v blatu otrok, obolelih s KVČB, kot tudi pri otrok s FMP, bolj zastopana skupina *Clostridium coccoides*, manj pa bakterijska vrsta *Enterococcus faecalis*.
- Ugotovili smo, da so imeli otroci s KVČB manj vseh bakterij v blatu kot otroci s FMP.
- Ugotovili smo, da je bilo pri otrocih s KVČB manj bakterij rodu *Bifidobacterium* v gramu blata kot pri otrocih s FMP, vendar se razmerje teh bakterij glede na vse bakterije pri obeh skupinah ni značilno razlikovalo.
- Ugotovili smo, da je bila v blatu otrok s KVČB manjša prisotnost bakterij skupin *Clostridium leptum* in *Clostridium coccoides*, ter vrste *Faecalibacterium prausnitzii*, ki na splošno veljajo za koristne v smislu ugodnega učinkovanja na epitelijske celice črevesja in moduliranja imunskega odziva, kot v blatu otrok s FMP.
- Ugotovili smo, da je bilo razmerje med bakterijami skupine *Clostridium leptum* in vsemi bakterijami, kot tudi skupine *Clostridium coccoides* in vsemi bakterijami, manjše pri otrocih, obolelih za KVČB, kot pri otrocih s FMP.
- Ugotovili smo, da so v gramu blata otrok s KVČB bolj številčne bakterije družine *Enterobacteriaceae*, ki je pogosto omenjena v povezavi s črevesnimi infekcijami in zagonom vnetja, kot pri otrocih s FMP, ter da je tudi razmerje teh bakterij glede na vse bakterije večje pri otrocih s KVČB.
- Ugotovili smo, da so v gramu blata otrok s KVČB bolj številčne bakterije *Enterococcus faecalis*, označene kot oportunistični patogen, kot pri otrocih s FMP, in da je tudi razmerje *Enterococcus faecalis* glede na vse bakterije večje pri otrocih s KVČB, kot pri otrocih s FMP.
- Ugotovili smo, da obstajajo razlike v sestavi mikrobiote blata otrok s FMP in otrok s KVČB, na podlagi česar lahko sklepamo, da je disbioza prisotna vsaj pri otrocih s

KVČB, saj se zdi njihova črevesna mikrobiota bistveno bolj različna od optimalne kot črevesna mikrobiota pri otrocih s FMP.

6 POVZETEK

Kronične vnetne črevesne bolezni in funkcionalne motnje prebavil lahko zelo vplivajo na kakovost življenja obolelega. Kažejo se lahko s podobnimi simptomi, kot so spremembe v vzorcih odvajanja blata, driska in abdominalne bolečine. Zdravil, ki bi dokončno odpravila KVČB ali FMP, še ne poznamo. Za razvoj KVČB in FMP ne poznamo točnih vzrokov. Številne raziskave kažejo, da so z razvojem omenjenih bolezni povezane spremembe v črevesni mikrobioti. Večina raziskav črevesne mikrobiote obolelih za KVČB in FMP so opravili na odraslih bolnikih, na otrocih in mladostnikih pa so te redke.

Namen magistrske naloge je bil primerjati mikrobioto v blatu otrok s KVČB in tistih s FMP. V raziskavo smo vključili 60 otrok in mladostnikov, starih med 2 in 18 let, ki se zdravijo na Pediatrični kliniki UKC Ljubljana. Raziskava je bila opravljena na vzorcih blata, odvzetih pred začetkom zdravljenja bolezni. Od 30 otrok s KVČB je bilo največ tistih, ki so imeli CB (17 otrok), sledili so tisti z UK (10 otrok), le trije od obravnavanih otrok pa so imeli NK. 30 otrok in mladostnikov je imelo FMP, predvsem SRČ. Ker je celotna raziskava sicer vključevala tudi odvzeme biopsijskih vzorcev otrok, zaradi etičnih razlogov ni bilo mogoče vključiti tudi zdravih otrok.

Pridobljeno blato smo najprej analizirali s pomočjo metode štetja KE na ploščah. Tako smo pridobili podatke o številu KE na gram blata posameznika za bakterije rodov *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* in *Staphylococcus*, družine *Enterobacteriaceae*, vrste *Escherichia coli* ter koliformnih bakterij. Iz vzorcev blata smo pridobili bakterijsko DNA, ki smo jo analizirali s PCR v realnem času. Tako smo ugotovili številčnost in delež naslednjih skupin oziroma vrst bakterij: vseh bakterij, družine *Enterobacteriaceae*, rodu *Bifidobacterium*, skupine *Bacteroides-Prevotella*, skupine *Clostridium leptum*, skupine *Clostridium coccoides*, vrste *Enterococcus faecalis* ter vrste *Faecalibacterium prausnitzii*. Rezultate smo izrazili v številu kopij 16S rDNA, oziroma v primeru vrste *Faecalibacterium prausnitzii* v številu celic. Izračunali smo tudi deleže (%) posameznih vrst oziroma skupin glede na vse bakterije. S statističnimi analizami smo ugotavliali značilnost razlik v sestavi mikrobiote med obema skupinama otrok.

Potrdili smo hipotezo, saj smo odkrili, da se mikrobiota blata med skupinama otrok s KVČB in tistimi s FMP razlikuje. Na podlagi štetja na ploščah in ugotavljanja številčnosti ter deleža posameznih skupin ali vrst bakterij s PCR v realnem času smo namreč ugotovili, da je v blatu otrok s KVČB manj vseh bakterij, bakterij rodu *Bifidobacterium*, skupine *Clostridium leptum*, skupine *Clostridium coccoides* in vrste *Faecalibacterium prausnitzii*, kot v blatu otrok s FMP. Tudi razmerje med *Clostridium leptum* oz. *Clostridium coccoides* in vsemi bakterijami v blatu je bilo pri otrocih s KVČB manjše kot pri otrocih s FMP. Opazne so bile tudi razlike med skupinama otrok v vsebnosti bakterij družine *Enterobacteriaceae* in vrste *Enterococcus faecalis*, saj je bilo teh v gramu blata otrok s KVČB več kot v blatu otrok s FMP. Razmerje med bakterijami družine

Enterobacteriaceae oz. bakterijami vrste *Enterococcus faecalis* in vsemi bakterijami pri otrocih s KVČB je bilo večje kot pri otrocih s FMP. Tako smo zaključili, da se mikrobiota blata otrok s KVČB in otrok s FMP razlikuje. Sklepali smo tudi, da je črevesna mikrobiota pri otrocih s KVČB najverjetneje drugačna kot normalna in je pri njej prisotna disbioza, saj je po preiskavah in literaturi sodeč le ta manj optimalna kot mikrobiota otrok s FMP.

Izsledki tega dela kažejo, da vsaj pri otrocih s KVČB obstajajo odstopanja v prisotnosti določenih bakterijskih vrst in bakterijskih skupin, oziroma je delež nekaterih bakterij v mikrobioti najverjetneje drugačno od normalnega in je prisotna disbioza. Za temeljitejše razumevanje teh razlik in njihovega pomena bi bilo potrebno opraviti več raziskav na tem področju, ki bi med drugim kot kontrolo uporabljale skupino zdravih otrok.

7 VIRI

- Aziz Q., Doré J., Emmanuel A., Guarner F., Quigley E.M. 2013. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology & Motility*, 25, 1: 4-15
- Balish E., Warner T. 2002. *Enterococcus faecalis* induces inflammatory bowel disease in interleukin-10 knockout mice. *American Journal of Pathology*, 160, 6: 2253-2257
- Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T., McMurdo M.E.T. 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 6: 3575-3581
- Benchimol E.I., Fortinsky K.J., Gozdyra P., Van den Heuvel M., Limbergen J.V., Griffiths M. 2011. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17, 1: 423-439
- Bernhard A.E., Field K.G. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4: 1587-1594
- Bernstein C.N. 2015. Treatment of IBD: where we are and where we are going. *The American Journal of Gastroenterology*, 110, 1: 114-126
- Brecelj J. 2014. Kronična vnetna črevesna bolezen pri otrocih. *Gastroenterolog*, 18, 1: 23-28
- Bogovič Matijašić B., Obermajer T., Lipoglavšek L., Grabnar I., Avguštin G., Rogelj I. 2014. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *European Journal of Nutrition*, 53, 4: 1051-1064
- Camillieri M., Heading R.C., Thompson W.G. 2002. Consensus report: clinical perspectives, mechanisms, diagnosis and management of irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16, 8: 1407-1430
- Canavan C., West J., Card T. 2014. The epidemiology of irritable bowel syndrome. *The Journal of Clinical Epidemiology*, 6: 71-80
- Carroll I.M., Ringel-Kulka T., Siddle J.P., Ringel Y. 2012. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility*, 24, 6: 521-530

Conte M.P., Schippa S., Zamboni I., Penta M., Chiarini F., Seganti F., Osborn J., Falconieri P., Borrelli O., Cucchiara S. 2006. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 55, 12: 1760-1767

Emeran A., Mayer M.D. 2008. Irritable bowel syndrome. *New England Journal of Medicine*, 358: 1692-1699

Escher J.C., Amil Dias J., Bochenek K., Buderus S., Bueno de Mesquita M., Bujanover Y., Buller H.A., Chong S.K.F., Cucchiara S., Fell J.M.E., Henker J., Hildebrand H., Hugot J.P., Jedynak U., Jenkins H., Kolacek S., Koletzko S., Lazowska I., Levine A., Lionetti P., Maly J., Montgomery S. M., Murch S.H., Murphy M.S., Paerregaard A., Sandhu B.K., Sawczenko A. 2005. Inflammatory bowel disease in children and adolescents. Recommendations for diagnosis: the Porto criteria. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41, 1: 1-7

Fakhoury M., Negrulj R., Mooranian A., Al-Salami H. 2014. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments. *Journal of Inflammation Research*, 7: 113-120

Ferkolj I. 2004. Zdravila za zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni. V: Kronična vnetna črevesna bolezen. Koželj M., Ferkolj I. (ur.). Novo mesto, Krka v medicini in farmaciji, 25, 1: 49-53

Fichera A., McCormack R., Rubin M.A., Hurst R.D., Michelassi F. 2005. Long-term outcome of surgically treated Crohn's colitis: a prospective study. *Diseases of the Colon & Rectum*, 48, 5: 963-969

Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., Jackson R.B. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7: 4117-4120

Garrett W.S., Gallini C.A., Yatsunenko T., Michaud M., DuBois A., Delaney M.L., Punit S., Karlsson M., Bry L., Glickman J.N., Gordon J.I., Onderdonk A.B., Glimcher L.H. 2010. *Enterobacteriaceae* act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*, 8, 3: 292-300

Geier M.S., Butler R.N., Howarth G.S. 2007. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 1: 1-11

Goldsmith J.R., Sartor R.B. 2014. The role of diet on intestinal microbiota metabolism: downstream impacts on host immune function and health, and therapeutic implications. *Journal of Gastroenterology*, 49, 5: 785-798

Hobson P.N. 1969. Rumen bacteria. *Methods in Microbiology*, 3B: 133-149

Hold G.L., Schwierz A., Aminov R.I., Blaut M., Flint H.J. 2003. Oligonucleotide probes that detect quantitatively significant groups of butyrate-producing bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7: 4320-4324

Hyams S.H. 2007. Inflammatory bowel disease. V: Nelson textbook of pediatrics. 18th ed. Kliegman M., Behrman R., Jenson H.B., Stanton B.F. (eds.). Philadelphia, Elsevier: 1580-1585

ISO 4833. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms. 2003: 9 str.

Kabeerdoss J., Sankaran V., Pugazhendhi S., Ramakrishna B.S. 2013. *Clostridium leptum* group bacteria abundance and diversity in the fecal microbiota of patients with inflammatory bowel disease: a case-control study in India. *Gastroenterology*, 13: 20, doi: 10.1186/1471-230X-13-20: 8 str.

Kanauchi O., Mitsuyama K., Araki Y., Andoh A. 2003. Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 4: 333-346

Kang S., Denman S.E., Morrison M., Yu Z., Dore J., Leclerc M., McSweeney C.S. 2010. Dysbiosis of fecal microbiota in Crohn's disease patients as revealed by a custom phylogenetic microarray. *Inflammatory Bowel Diseases*, 16, 12: 2034- 2042

Kolar G. 2004. Klinična slika in laboratorijske preiskave pri kronični vnetni črevesni bolezni. V: Kronična vnetna črevesna bolezen. Koželj M., Ferkolj I. (ur.). Novo mesto, Krka v medicini in farmaciji, 25, 1: 17-22

Korterink J.J., Ockeloen L., Benninga M.A., Tabbers M.M., Hilbink M., Deckers-Kocken J.M. 2014. Probiotics for childhood functional gastrointestinal disorders: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica*, 103, 4: 365-372

Košmelj K., Kastelec D. 2002. Osnove statistične analize za urejenostne spremenljivke. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo, 79, 1: 71-87

- Logar-Car G. 1995. Endoskopska diagnostika in zdravljenje kroničnih vnetnih bolezni črevesja. V: Problematika diferenciacije spola. Novosti v intenzivni terapiji. Kronične vnetne bolezni črevesja. Kržišnik C., Battelino T. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo: 147-155
- Longstreth G.F., Thompson W.G., Shey W.D., Houghton L.A., Mearin F., Spiller R. C. 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, 130, 5: 1480-1491
- Lopetuso L.R., Scaldaferri F., Petito V., Gasbarrini A. 2013. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens*, 5, 1:23, doi: 10.1186/1757-4749-5-23: 8 str.
- M'Koma A.E. 2013. Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. Clinical medicine insights. *Gastroenterology*, 14, 6: 33-47
- Malinen E., Rinttilä T., Kajander K., Mättö J., Kassinen A., Krogus L., Saarela M., Korpela R., Palva A., 2005. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *The American Journal of Gastroenterology*, 100, 2: 373-82
- Mariat D., Firmesse O., Levenez F., Guimarães V., Sokol H., Doré J., Corthier G., Furet J.P. 2009. The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9, 9: 123, doi: 10.1186/1471-2180-9-123: 6 str.
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Miyamoto Y., Takada T., Matsumoto K., Oyaizu H., Tanaka R. 2002. Development of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 11: 5445-5451
- Matsuki T., Watanabe K., Fujimoto J., Takada T., Tanaka R. 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 12: 7220-7228
- Mättö J., Maunuksela L., Kajander K., Palva A., Korpela R., Kassinen A., Saarela M. 2005. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome-a longitudinal study in IBS and control subjects. *Search Results FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 2: 213-222
- McFarland L.V., Dublin S. 2008. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 17: 2650-1261

Megran D. W. 1992. Enterococcal endocarditis. Clinical Infectious Diseases, 15, 1: 63-71

Meier H., Koob C., Ludwig W., Amann R., Frahm E., Hoffmann S., Obst U., Schleifer K.H. 1997. Detection of enterococci with rRNA targeted DNA probes and their use for hygienic drinking water control. Water Science and Technology, 35, 11-12: 437-444

Molodecky N.A., Soon I.S., Rabi D.M., Ghali W.A., Ferris M., Chernoff G., Benchimol E.I., Panaccione R., Ghosh S., Barkema H.W., Kaplan G.G. 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. Gastroenterology, 142, 1: 46-54

Mondot, S., Kang S., Furet J.P., de Carcer D.A., McSweeney C., Morrison M., Marteau P., Dore J., Leclerc M. 2011. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. Inflammatory Bowel Diseases, 17, 1: 185-192

Ohkusa T., Sato N. 2005. Antibacterial and antimycobacterial treatment for inflammatory bowel disease. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 20, 3: 340-351

Orel R. 1995. Epidemiologija in etiopatogeneza kroničnih vnetnih bolezni črevesa. V: Izbrana poglavja iz pediatrije : problematika diferenciacije spola, novosti v intenzivni terapiji, kronične vnetne bolezni črevesja. Kržišnik C., Battelino T. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo: 147-155

Orel R. 2005. Epidemiologija kronične vnetne črevesne bolezni pri otrocih. V: Zbornik / XV. srečanje pediatrov v Mariboru z mednarodno udeležbo in II. srečanje medicinskih sester z mednarodno udeležbo, 15. in 16. aprila 2005. Gregorčič A. (ur.). Maribor: 31-34

Orel R. 2010. Sindrom razdražljivega črevesja. Medicinski razgledi, 49: 479-485

Orel. R. 2011. Mechanisms behind functional gastrointestinal disorders. V: The 2nd South-Eastern European pediatric gastroenterology (SEEPEG) meeting, November 11th and 12th, 2011, Bled. Vidmar B. (ed.). Ljubljana, Medicinski razgledi 50, Suppl. 5: 9-13

Orel R., Kamhi T., Vidmar G., Mamula P. 2009a. Epidemiology of pediatric chronic inflammatory bowel disease in central and western Slovenia, 1994-2005. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 48, 5: 579-586

Orel R., Sedmak M., Breclj J., Kamhi T., Homan M., Mikolič J. 2009b. Kronične vnetne črevesne bolezni. Ljubljana, Celzija: 16 str.

- Ott S.J. Musfeldt M., Wenderoth D.F., Hampe J., Brant O., Folsch U.R., Timmis K.N., Schreiber S. 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53, 5: 685-693
- Papadopoulou A. 2011 Functional gastrointestinal disorders in infancy and childhood: Rome III diagnostic criteria. V: The 2nd South-Eastern European pediatric gastroenterology (SEEPEG) meeting, November 11th and 12th, 2011, Bled. Vidmar B. (ed.). Ljubljana, Medicinski razgledi 50, Suppl. 5: 3-8
- Picard C., Fioramonti J., Francois A., Robinson T., Neant F., Matuchansky C. 2005. Review article: bifidobacteria as probiotic agents - physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22, 6: 495-512
- Prakash S., Rodes L., Coussa-Charley M., Tomaro-Duchesneau C. 2011. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: Targets & Therapy*, 5: 71-86
- Rajilić-Stojanović M., de Vos W.M. 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*, 38, 5: 996-1047
- Rasquin A., Di Lorenzo C., Forbes D., Guiraldes E., Hyams J.S., Staiano A., Walker L.S. 2006. Childhood functional gastrointestinal disorders: child/adolescent. *Gastroenterology*, 130, 5: 1527-1537
- Rinttilä T., Kassinen A., Malinen E., Krogius L., Palva A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 1166-1177
- rrnDB*. 2013. The ribosomal RNA database curated by the Schmidt laboratory. Michigan, University of Michigan, Center For Microbial Systems <https://rrndb.umms.med.umich.edu/search/> (15. feb. 2013)
- Salonen A., de Vos W.M., Palva A. 2010. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology*, 156, Pt 11: 3205-3215
- Sartor B.R. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 134, 2: 577-594
- Scheppach W. 1994. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35, 1: S35-S38

Sedmak M. 1995. Klinična slika in diferencialna diagnoza kroničnih vnetij prebavil. V: Problematika diferenciacije spola. Novosti v intenzivni terapiji. Kronične vnetne bolezni črevesja. Kržišnik C., Battelino T. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta, Katedra za pediatrijo: 156-165

Sha S., Xu B., Wang X., Zhang Y., Wang H., Kong X., Zhu H., Wu K. 2012. The biodiversity and composition of the dominant fecal microbiota in patients with inflammatory bowel disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75, 3: 245-251

Shanahan, F., 2004. Probiotics in inflammatory bowel disease-therapeutic rationale and role. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 6: 809-818

Shukla R., Ghoshal U., Dhole T.N., Ghoshal U.C. 2015. Fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome compared with healthy controls using real-time polymerase chain reaction: an evidence of dysbiosis. *Digestive Diseases and Sciences*, 60, 10: 2953-2962

Sokol H., Seksik P., Rigottier-Gois L., Lay C., Lepage P., Podglajen I., Marteau P., Dore' J. 2006. Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12, 2: 106-111

Takaishi H., Matsukib T., Nakazawa A., Takadab T., Kadob S., Asaharab T., Kamadaa N., Sakurabaa A., Yajimaa T., Higuchia H., Inouea N., Ogataa H., Iwaoa Y., Nomotob K., Tanakab R., Hibia T. 2007. Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 5-6: 463-472

Tana C., Umesaki Y., Imaoka A., Handa T., Kanazawa M., Fukudo S. 2010. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility*, 22, 5: 512-519

Thompson-Chagoyan O.C., Maldonado J., Gil A. 2005. Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): role of intestinal microbiota and gut associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition*, 24, 3: 339-352

Tlaskalová-Hogenová H., Stepánková R., Hudcovic T., Tucková L., Cukrowska B., Lodinová-Zádníková R., Kozáková H., Rossmann P., Bártová J., Sokol D., Funda D.P., Borovská D., Reháková Z., Sinkora J., Hofman J., Drastich P., Kokesová A.

2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 93, 2-3: 97-108
- Urlep D., Blagus R., Orel R. 2015. Incidence trends and geographical variability of pediatric inflammatory bowel disease in Slovenia: a nationwide study. *BioMed Research International*, ID 921730, doi: 10.1155/2015/921730: 8 str.
- Urlep D., Trop T.K., Blagus R., Orel R. 2014. Incidence and phenotypic characteristics of pediatric IBD in Northeastern Slovenia, 2002-2010. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58, 3: 325-332
- Van Assche G., Dignass A., Panes J., Beaugerie L., Karagiannis J., Allez M., Ochsenkühn T., Orchard T., Rogler G., Louis E., Kupcinskas L., Mantzaris G., Travis S., Stange E. 2010. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 4, 11: 7-27
- Van Dyke M.I., McCarthy A.J. 2002. Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4: 2049-2053
- Van Immerseel F., Ducatelle R., De Vos M., Boon N., Van De Wiele T., Verbeke K., Rutgeerts P., Sas B., Louis P., Flint H.J. 2010. Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *Journal of Medical Microbiology*, 59, Pt 2: 141-143
- Vinolo A.R.M., Rodrigues G.H., Nachbar T.R., Curi R. 2011. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. *Nutrients*, 3, 10: 858-876
- Wang R.F., Cao W.W., Cerniglia C.E. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4: 1242-1247
- Wang W., Chen L., Zhou R., Wang X., Song L., Huang S., Wang G., Xia B. 2014. Increased proportions of *Bifidobacterium* and the *Lactobacillus* group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 2: 398-406

PRILOGA A

Preglednice z vrednostmi, ki so podlaga za kvantilne dijagrame, predstavljene v poglavju 4.1.1.2

Priloga A1: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Bifidobacterium*.

<i>Bifidobacterium</i>		
	KVČB [log KE/g]	Ostali [log KE/g]
Minimum	4,70*	4,70*
Prvi kvartil - Q ₁	5,20	6,65
Mediana	6,64	7,46
Tretji kvartil - Q ₃	7,49	8,05
Maksimum	9,03	9,28

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije

Priloga A2: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Lactobacillus*.

<i>Lactobacillus</i>		
	KVČB [log KE/g]	Ostali [log KE/g]
Minimum	3,70*	3,70*
Prvi kvartil - Q ₁	5,01	5,50
Mediana	6,54	6,53
Tretji kvartil - Q ₃	7,46	7,27
Maksimum	8,78	8,56

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije

Priloga A3: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterococcus*.

<i>Enterococcus</i>		
	KVČB [log KE/g]	Ostali [log KE/g]
Minimum	3,70*	3,70*
Prvi kvartil - Q ₁	3,70*	3,70*
Mediana	3,70*	3,70*
Tretji kvartil - Q ₃	5,63	4,07
Maksimum	7,74	8,78

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije

Priloga A4: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterobacteriaceae*.

<i>Enterobacteriaceae</i>		
	KVČB [log KE/g]	Ostali [log KE/g]
Minimum	3,70*	3,70*
Prvi kvartil - Q1	3,70*	3,70*
Mediana	5,06	4,63
Tretji kvartil - Q3	5,94	5,27
Maksimum	8,78	7,55

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije

Priloga A5: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Escherichia coli*.

<i>Escherichia coli</i>		
	KVČB [log KE/g]	Ostali [log KE/g]
Minimum	3,70*	3,70*
Prvi kvartil - Q1	3,70*	3,70*
Mediana	4,35	3,80
Tretji kvartil - Q3	5,34	5,62
Maksimum	8,78	8,78

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije

Priloga A6: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za koliformne bakterije.

Koliformne bakterije		
	KVČB [log KE/g]	Ostali [log KE/g]
Minimum	3,70*	3,70*
Prvi kvartil - Q1	4,05	3,70*
Mediana	5,00	5,33
Tretji kvartil - Q3	5,40	5,85
Maksimum	8,78	8,78

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije

Priloga A7: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Staphylococcus*.

Staphylococcus		
	KVČB [log KE/g]	Ostali [log KE/g]
Minimum	3,70*	3,70*
Prvi kvartil - Q_1	3,70*	3,70*
Mediana	3,70*	3,70*
Tretji kvartil - Q_3	4,13	3,70*
Maksimum	7,78	6,46

* vrednost je enaka polovični vrednosti meje detekcije, ki smo jo po dogovoru pripisali vzorcem, pri katerih so rezultati štetja padli pod mejo detekcije

PRILOGA B

Preglednice z vrednostmi, ki so podlaga za kvantilne diagrame, predstavljene v poglavju 4.2.1.2

Priloga B1: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za vse bakterije.

Vse bakterije		
	KVČB [log št. kopij 16S rDNA /g]	Ostali [log št. kopij 16S rDNA /g]
Minimum	10,54	10,64
Prvi kvartil - Q_1	11,68	12,01
Mediana	12,16	12,52
Tretji kvartil - Q_3	12,52	12,82
Maksimum	12,89	13,10

Priloga B2: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Bifidobacterium*.

<i>Bifidobacterium</i>		
	KVČB [log št. kopij 16S rDNA /g]	Ostali [log št. kopij 16S rDNA /g]
Minimum	6,47	7,58
Prvi kvartil - Q_1	8,64	8,82
Mediana	9,13	9,85
Tretji kvartil - Q_3	9,85	10,10
Maksimum	10,77	11,17

Priloga B3: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Bifidobacterium/vse bakterije*.

<i>Bifidobacterium/vse bakterije</i>		
	KVČB [%]	Ostali [%]
Minimum	0,00	0,01
Prvi kvartil - Q_1	0,04	0,08
Mediana	0,14	0,17
Tretji kvartil - Q_3	0,34	0,39
Maksimum	0,97	1,67

Priloga B4: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Clostridium leptum*.

<i>Clostridium leptum</i>		
	KVČB [log št. kopij 16S rDNA /g]	Ostali [log št. kopij 16S rDNA /g]
Minimum	6,48	7,23
Prvi kvartil - Q_1	8,01	8,79
Mediana	8,91	10,29
Tretji kvartil - Q_3	10,03	11,23
Maksimum	12,18	12,04

Priloga B5: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Clostridium leptum/vse bakterije*.

<i>Clostridium leptum/vse bakterije</i>		
	KVČB [%]	Ostali [%]
Minimum	0,00	0,00
Prvi kvartil - Q_1	0,03	0,12
Mediana	0,14	0,44
Tretji kvartil - Q_3	0,36	3,46
Maksimum	19,67	12,37

Priloga B6: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Clostridium coccoides*.

<i>Clostridium coccoides</i>		
	KVČB [log št. kopij 16S rDNA /g]	Ostali [log št. kopij 16S rDNA /g]
Minimum	6,10	8,93
Prvi kvartil - Q_1	10,07	10,60
Mediana	10,72	11,39
Tretji kvartil - Q_3	11,11	11,63
Maksimum	11,62	12,09

Priloga B7: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Clostridium coccoides/vse bakterije*.

<i>Clostridium coccoides/vse bakterije</i>		
	KVČB [%]	Ostali [%]
Minimum	0,00	1,60
Prvi kvartil - Q_1	2,25	3,74
Mediana	3,54	5,64
Tretji kvartil - Q_3	5,71	8,42
Maksimum	15,79	10,34

Priloga B8: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Bacteroides-Prevotella*.

<i>Bacteroides-Prevotella</i>		
	KVČB [log št. kopij 16S rDNA /g]	Ostali [log št. kopij 16S rDNA /g]
Minimum	8,65	8,65
Prvi kvartil - Q ₁	9,07	9,88
Mediana	10,69	10,85
Tretji kvartil - Q ₃	11,30	11,35
Maksimum	11,82	12,10

Priloga B9: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Bacteroides-Prevotella/vse bakterije*.

<i>Bacteroides-Prevotella/vse bakterije</i>		
	KVČB [%]	Ostali [%]
Minimum	0,02	0,02
Prvi kvartil - Q ₁	1,43	0,49
Mediana	3,18	2,11
Tretji kvartil - Q ₃	7,07	6,59
Maksimum	37,44	22,81

Priloga B10: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterobacteriaceae*.

<i>Enterobacteriaceae</i>		
	KVČB [log št. kopij 16S rDNA /g]	Ostali [log št. kopij 16S rDNA /g]
Minimum	5,71	5,71
Prvi kvartil - Q ₁	8,47	7,24
Mediana	9,48	8,31
Tretji kvartil - Q ₃	10,31	9,08
Maksimum	11,15	10,95

Priloga B11: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Enterobacteriaceae/vse bakterije*.

<i>Enterobacteriaceae/vse bakterije</i>		
	KVČB [%]	Ostali [%]
Minimum	0,00	0,00
Prvi kvartil - Q ₁	0,04	0,00
Mediana	0,37	0,01
Tretji kvartil - Q ₃	1,12	0,13
Maksimum	12,79	16,62

Priloga B12: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Faecalibacterium prausnitzii*.

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>		
	KVČB [log št. celic/g]	Ostali [log št. celic/g]
Minimum	5,64	8,86
Prvi kvartil - Q ₁	9,86	9,86
Mediana	10,17	10,59
Tretji kvartil - Q ₃	10,52	10,91
Maksimum	11,21	11,33

Priloga B13: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Faecalibacterium prausnitzii/vse bakterije*.

<i>Faecalibacterium prausnitzii/vse bakterije</i>		
	KVČB [% št. celic/št. kopij 16S rDNA]	Ostali [% št. celic/št. kopij 16S rDNA]
Minimum	0,00	0,21
Prvi kvartil - Q ₁	0,26	0,82
Mediana	0,77	1,42
Tretji kvartil - Q ₃	5,36	2,14
Maksimum	37,08	3,37

Priloga B14: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za *Enterococcus faecalis*.

<i>Enterococcus faecalis</i>		
	KVČB [log št. kopij 16S rDNA /g]	Ostali [log št. kopij 16S rDNA /g]
Minimum	1,11	1,11
Prvi kvartil - Q ₁	1,49	1,49
Mediana	4,33	2,30
Tretji kvartil - Q ₃	5,08	4,43
Maksimum	8,48	9,22

Priloga B15: Vrednosti, prikazane v kvantilnemu diagramu za razmerje *Enterococcus faecalis/vse bakterije*.

<i>Enterococcus faecalis/vse bakterije</i>		
	KVČB [%]	Ostali [%]
Minimum	$2,01 \times 10^{-10}$	$2,47 \times 10^{-10}$
Prvi kvartil - Q ₁	$8,46 \times 10^{-9}$	$1,57 \times 10^{-9}$
Mediana	$1,90 \times 10^{-6}$	$1,40 \times 10^{-8}$
Tretji kvartil - Q ₃	$5,12 \times 10^{-5}$	$3,30 \times 10^{-7}$
Maksimum	0,01692	0,02103