

Afslutningsrapport

In vitro-metoder til vurdering af mikroorganismers
adhæsionsegenskaber med henblik på probiotisk effekt

Mejeribrugets ForskningsFond

Rapport nr. 2003-53

Maj 2003



mejeriforeningen

danish dairy board

AFSLUTNINGSRAPPORT TIL MFF FOR PROJEKTET

***In vitro*-metoder til vurdering af mikroorganismers adhæsionsegenskaber med henblik på probiotisk effekt**

Projektleder: Professor, dr. med. Kim Fleischer Michaelsen, IHE, KVL

Øvrige deltagere: Professor Mogens Jakobsen, MLI, KVL
Overlæge, dr. med. Anders Pærregaard, H:S Hvidovre Hospital
Lektor Peter Lange Møller, MLI, KVL
Forskningsassistent Dennis Nielsen, MLI, KVL
Læge, Ph.D. Vibeke Rosenfeldt, H:S Hvidovre Hospital
Afdelingsleder, Ph.D. Peter Stougaard, Bioteknologisk Institut
Ph.D. Flemming Jørgensen, Bioteknologisk Institut

Følgende har deltaget som samarbejdspartnere i delprojekter:
Lektor Per Sangild, Institut for Husdyrbrug og Husdyrsundhed, KVL
Professor, dr. med. Mogens Helweg Claesson, Institut for
Eksperimentel Immunologi, Panum Institut

Projektperiode: 1. oktober 1999 til 31. december 2002

Projektet er et samarbejdsprojekt under Fødevareteknologiprogrammet (FØTEK III) i samarbejde med Mejeribrugets ForskningsFond.

Sammendrag

***In vitro*-metoder til vurdering af mikroorganismers adhæsionsegenskaber med henblik på probiotisk effekt**

Der er udviklet og indkørt dyrkningsuafhængig DNA baseret metoder til direkte påvisning af de probiotiske bakterier i komplekse miljøer, f.eks. tarmindehold. FISH-metoden ("Fluorescent *In Situ* Hybridisation") er således udviklet til påvisning af probiotiske bakterier som efter indgift er lokaliseret til tarmslimhinden ved direkte fluorescens mikroskopi. Metoden *in situ* PCR til direkte påvisning af probiotiske bakteriers metaboliske aktivitet i blandingskulturer blev delvist udviklet. Den endelige metodeudvikling viste sig ikke at være mulig indenfor projektets ressource og tidsramme. Vi prioriterede i stedet for en videreudvikling af DGGE metoden (denaturerende gradient gel elektroforese). Denne metodes anvendelighed blev verificeret og den førte til værdifulde resultater vedrørende tarmslimhindens mikropopulation og udpegning af potentielle nye probiotiske kulturer.

Projektet har resulteret i identifikation af 10 lovende stammer af bifidobakterier og laktobaciller med adhæsionsevne og andre positive egenskaber, herunder antimikrobiel effekt overfor fødevarerborne patogene bakterier. Disse stammers adhæsionsevne vil blive bekræftet i et interventionsforsøg, hvor stammerne vil blive givet til raske voksne forsøgspersoner, der skal have foretaget en kontrol kikkert undersøgelse af tyktarmen. Slimhinde biopsierne vil blive undersøgt for tilstedeværelse af de indgivne bakterier.

Arbejdet med ædhænsionsmodellerne fik en anden drejning end forudset. Planerne om CaCo-2 tarmmucus fra kaniner blev opgivet til fordel for mere lovende modeller. Der blev opnået gode resultater fra projektet med grise, og præliminære data tyder på, at det også er tilfældet med de gensplejsede mus. Erfaringerne der er indvundet i projektet har desuden ført os frem mod udviklingen af en funktionel epithelcellemodel, som er mere lovende end de modeller, der var beskrevet i den oprindelige ansøgning.

Projektet skal ses som en del af et længerevarende tværfagligt forskningsprojekt med et frugtbart samarbejde mellem forskere indenfor levnedsmiddelmikrobiologi, klinisk mikrobiologi, human ernæring, pædiatrisk gastroenterologi og immunologi. Det startede med projektet "Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakterier", er videreført i det aktuelle projekt og fortsættes i det nye samarbejdsprojekt med MFF under Innovationsloven. I det projekt fortsætter vi arbejdet med at udvælge og teste lovende stammer, fortsætter med arbejdet med celle- og humanmodeller og supplerer disse med undersøgelser af effekter på immunsystemet.

Summary

We have developed and used culture free DNA based methods to evaluate probiotic bacteria in complex environments, such as intestinal content. The FISH method has been developed to identify direct fluorescence microscopy probiotic bacteria which after administration have been located to the intestinal mucosa. The *in situ* PCR method to directly show the metabolic activity of probiotic bacteria in mixed cultures was partly developed. The final method development was not possible within the budget and time frame of the project. Instead we gave priority to further development of the DGGE method. The applicability of this method was verified and it lead to valuable results concerning the micro-population of the mucosa and selection of new potential probiotic cultures.

The project has resulted in identification of 10 promising strains of bifidobacteria and lactobacillus with adhesion ability and other positive qualities, such as antimicrobial effect towards food borne pathogenic bacteria. The adhesion ability of these strains will be examined in an intervention study where the strains will be given to healthy adult subjects admitted for coloscopy. The mucosa biopsies will be examined for the presence of the administered bacteria.

The plans for the adhesion models were changed. We had planned using CaCo-2 cells and mucus from rabbit intestines, but these plans were abandoned for more promising models. We have produced interesting results from the project with pigs, and preliminary data indicated that this would also be the case with the gene modified mice. The experiences gained in the project have helped us in developing a functional epithelial cell model, which is more promising than the models that were described in the original application.

The project is a continuation of a long-term cross-sectional, research project with a fruitful collaboration between researchers from food microbiology, clinical microbiology, human nutrition, paediatric gastroenterology and immunology. The first project addressed physiological aspects of “lactic acid bacteria in the human” which is continued in the current project and will be continued in the new collaboration project with MFF under the Danish Innovation Act. In this project we will continue selecting and testing promising strains, continue using cell and human models, and combine these with examinations of the effects on the immune system.

Formål

På baggrund af de lovende resultater opnået i det tidligere FØTEK II projekt "Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakterier" var det projektets formål at udvikle adhæsiionsmodeller samt andre lovende *in vitro* metoder med henblik på at undersøge udvalgte kulturers probiotiske egenskaber. Det var endvidere formålet, at verificere de *in vitro* påviste egenskaber ved hjælp af studier over *in vivo* adhæsion af testkulturer til tarmslimhinden hos patienter, der får foretaget planlagt endoskopi (kikkertundersøgelse af tarmen). Projektets specifikke formål kan kort opsummeres i følgende punkter:

- udvikling af DNA og enzymbaserede metoder til påvisning af probiotiske bakterier og bestemmelse af deres metaboliske aktivitet i blandingskulturer og interaktionsforsøg
- opstilling af adhæsiionsmodeller baseret på CaCo-2 cellekulturer samt adhæsion til tarm mucus fra kaniner
- verifikation af udvalgte *in situ* adhæsiionsmodeller ved adhæsiionsforsøg til tarmslimhinden hos patienter, der gennemgår endoskopi

Udover nye *in vitro* modeller vil de undersøgelsesmetoder, der er udviklet i det tidligere FØTEK II projekt, primært syre- og galdetolerance samt antimikrobielle egenskaber blive anvendt med henblik på endelig udpegning af egnede probiotiske kulturer.

Projektets baggrund

Probiotika defineres som bakterier der, hvis de indtages i tilstrækkelige store mængder, fremmer menneskers sundhed. De probiotiske bakterier virker bl.a. ved at binde sig til tarmslimhinden og hindre sygdomsfremkaldende bakterier i at etablere sig. Desuden påvirker probiotika sandsynligvis tarmslimhindens immunsystem og forsvarsmekanismerne mod uønskede mikroorganismer. De bakterier der har probiotiske egenskaber findes primært blandt mælkesyrebakterier, bifidobakterier og enterokokker, men også gærceller synes at have probiotiske egenskaber.

Det er ikke muligt at undersøge alle bakteriestammer for mulige probiotiske egenskaber i studier med mennesker, da der for hver bakteriekultur der ønskes undersøgt, skal gennemføres forsøg med 50-100 personer. Der er derfor et behov for at finde laboratoriemetoder, der kan identificere og karakterisere kulturer med de mest lovende egenskaber. Et led i etableringen af effektive metoder er også at validere om de påviste egenskaber kan bekræftes i dyremodeller og mennesker.

Dyrkningsfrie metoder

Introduktion

Nærværende projekts udvikling af nye mikrobiologiske metoder skal ses på baggrund af, at de traditionelle metoder er ressourcekrævende, og mindre velegnede til studier af tarmens mikroorganismer. Det skyldes, at forskellige bakterier skal dyrkes på forskellige medier og skal rendyrkes, før bakterierne kan identificeres. Desuden får man kun kendskab til de bakterier, der er i stand til at formere sig under de anvendte dyrkningsbetingelser. En meget stor del af bakterierne i tarmen har man aldrig været i stand til at dyrke. Det gælder specielt de bakterier, som er stærkt anaerobe. Derfor giver de traditionelle dyrkningsmetoder et dårligt billede af de bakterier, der findes i tarmen. Med nye molekylærbiologiske metoder åbnes der for nye muligheder til at beskrive den totale tarmflora, og dermed hvordan den påvirker sundhed og sygdom.

Både FISH og *in situ* PCR er metoder, hvor mikroskopi anvendes til detektion af et signal på enkeltcelle-niveau. Med FISH er det nukleinsyren i de mange tusinde ribosomer per bakterie, som gør det muligt at detektere signalet fra en enkelt celle, medens *in situ* PCR metoden bygger på opformering af en valgt nukleinsyre-sekvens. Således kan FISH give information om typen af bakterie, medens *in situ* PCR kan oplyse om bakteriens metaboliske aktivitet. Den tredje metode, kvantitativ DGGE, kan bruges til at beskrive sammensætningen af en mikropopulation i en given prøve.

FISH

Det var formålet at udvikle FISH prober til specifik påvisning af de 5 *Lactobacillus* stammer, der blev brugt til intervention i projektet ”Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakterier”. Mere præcist var det et mål at genfinde disse stammer i biopsier fra patienter, som forinden har indtaget kulturer af de pågældende bakterier.

Der blev udarbejdet en FISH procedure, der kunne identificere lactobaciller og dermed beskrive, hvor i biopsier lactobacillerne befinder sig. Som baggrund for metodeudviklingen blev der foretaget en sekventering af 16S rDNA fra de 5 *Lactobacillus* stammer. Der blev herefter udviklet FISH prober, der specifikt skulle kunne genkende de 5 stammer. Resultaterne viste, at det var muligt at adskille arter af lactobaciller med FISH, men ikke muligt at adskille nært beslægtede stammer. Således var det ikke muligt at adskille stammer under samme art, hvilket i nogen omfang begrænsede metodens anvendelighed. I **Figur 1** vises anvendelsen af FISH på biopsi.

In situ PCR

Formålet var at udvikle *in situ* PCR metode til brug for lactobaciller. Med udgangspunkt i de 5 udvalgte *lactobacillus* stammer blev det forsøgt at anvende metoden til måling af genekspression i blandingskulturer og i biopsier. Den udviklede metode viste sig imidlertid at være meget lidt robust. Det signal, der blev opnået var ikke et specifikt PCR signal, men skyldes snarere uspecifik binding til de pågældende lactobaciller. Det blev vurderet, at det ikke indenfor projektets rammer var muligt at udvikle en robust og reproducérbar *in situ* PCR metode.

DGGE

En betydelig del af projektets ressourcer har været brugt til at etablere og videreudvikle DGGE metoden (denaturerende gradient gel elektroforese) til at karakterisere bakterie-sammensætningen på biopsier. Principperne for DGGE analysen er vist i **Figur 2**.

I projektet er DGGE metoden udviklet til at påvise lactobaciller og bifidobakterier fra biopsier ved at bruge en nested PCR metode. Denne metode er baseret på, at der først laves en PCR reaktion af det DNA, der er isoleret fra biopsierne. Ved denne PCR reaktion anvendes i trin 1 specifikke primere, der selektivt amplificerer 16S rDNA fra lactobaciller eller bifidobakterier. Fra denne PCR reaktion bruges det isolerede DNA til en ny PCR reaktion, med generelle primere. Dette PCR produkt analyseres derefter på en DGGE gel, hvor tilstedeværelsen af lactobaciller eller bifidobakterier kan detekteres ved tilstedeværelsen af bånd på gelen og efterfølgende DNA sekventering.

I projektet er tidligere problemer omkring DGGE metoden blevet løst. Det har tidligere været vanskeligt at sekventere bånd fra DGGE gelerne. Dette er blevet løst ved at farve gelerne med SYBR-GOLD i stedet for at sølvfarve gelerne. Problemet ser ud til at skyldes, at DNA delvist

bliver ødelagt ved sølvfarvningen. Det andet problem har været, at der fra fæces og biopsier har været problemer med, at PCR amplificerer det isolerede DNA. Dette problem er nu løst ved at bruge en ny metode til at isolere DNA fra disse prøver.

De opnåede resultater viser, at det er muligt både at identificere lactobaciller og bifidobakterier fra biopsier. Identifikationen ud fra DGGE gelerne er i overensstemmelse med den identifikation, der er lavet ud fra traditionelle dyrkningsmetoder for bakterier, som kan dyrkes. Både fra de traditionelle dyrkningsmetoder og ved DGGE ses, at der er stor individuel forskel på sammensætningen af floraen hos de enkelte forsøgspersoner. Derimod er der ikke stor variation hos den enkelte fra de tre forskellige dele af colon, der er blevet undersøgt.

Dyremodeller

Grisemodel til vurdering af tidlig kolonisering i mavetarmkanalen

Tarmsystemet er ved fødslen sterilt men koloniseres under fødslen, blandt andet fra moderens vaginal- og tarmflora. Denne tidlige kolonisering ser ud til at have betydning for den blivende flora og har sandsynligvis også betydning for udvikling af immunsystemet og risikoen for udvikling af allergi. Det er blandt andet set, at børn født med kejsersnit har en forøget risiko for udvikling af visse allergiske sygdomme. Børn født ved kejsersnit har også måneder efter fødslen en anden tarmflora end børn født vaginalt.

For at undersøge denne tidlige kolonisering har vi i samarbejdet med Per Sangild, Institut for Husdyrbrug og Husdyrsundhed på KVL, etableret en grisemodel. Formålet var

- 1) at undersøge graden af naturlige mikrobiel kolonisering indenfor de første levetimer
- 2) at påvise fasthæftning/kolonisering af probiotiske stammer i 7 dage gamle grise inokuleret ved fødslen
- 3) at påvise en ændret mikrobiel sammensætning i forhold til 7 dage gamle kontrolgrise.

Fra en so med 15 smågrise blev 3 nyfødte kontrolgrise aflivet efter 3 timer mhp. udtagning af prøver. Fire nyfødte grise blev inokuleret med 1 g tørkultur af *L. reuteri* og *L. rhamnosus* pulver umiddelbart efter fødslen (indenfor 10 minutter). Tolv timer efter fødslen fik de en ny dosis. Grisene blev aflivet, og der blev taget prøver efter 7 dage. Tre tilfældige kontrolgrise blev aflivet sammen med de 4 inokulerede grise efter 7 dage. Formålet var at give indtryk af, om der i det miljø grisene går i sker en sekundær inokulering fra de andre smågrise, samt undersøge om den samlede mikroflora afviger væsentligt fra mikrofloraen i de inokulerede grise. Der blev taget prøver fra proksimal og distal tyndtarm samt midt i colon. Der blev taget både tarmindehold og mucosa skrab fra hvert afsnit.

Fra de udtagne prøver blev indholdet af bakterier karakteriseret ved at dyrke på laboratoriesubstratet BHI, der er et rigt substrat, der understøtter væksten af de fleste dyrkbare bakterier, samt på MRS der er selektivt for bifidobakterier, samt lactobaciller, enterokokker og beslægtede mælkesyrebakterier. Fra BHI pladerne blev der udtaget et repræsentativt antal bakterier fra hver prøve og disse blev analyseret med ITS-PCR. Isolaterne kunne derved inddeles i grupper med ens ITS profil, og fra hver gruppe blev 16S rDNA sekvensen bestemt og sammenlignet med sekvenser i databaser. Fra disse resultater er det muligt at bestemme sammensætningen af de dominerende dyrkbare bakterier, som det er vist i **Tabel 1**.

Fra resultaterne ses, at der sker en forandring af tarmfloraen i løbet af de første 7 dage, samt at floraens sammensætning er mere kompleks dag 7. Hos mennesker er der rapporteret, at der

sker en udvikling fra aerobe, hovedsageligt enterobakterier til en flora der er domineret af bifidobakterier i de første dage. En tilsvarende udvikling kan ikke ses fra disse resultater. De nyfødte grises flora domineres af *Eubacterium spp.* og af mælkesyrebakterier generelt og har stor lighed med bakterier, der ses hos grisene ved dag 7. Derimod ses at grisene dag 7 har et betydeligt antal *E. coli*, og desuden blev der isoleret en enkelt *Salmonella enterica*. Til forskel fra mennesker blev der ikke fundet bifidobakterier hos grisene, hvilket er i overensstemmelse med andre resultater, der viser at bifidobakterier ikke forekommer hyppigt hos grise.

Af de indgivne probiotiske bakterier blev kun *L. reuteri* genfundet hos en gris, hvilket viser at denne bakterie har været i stand til at kolonisere tarmen hos denne gris. Ud fra dette resultat sammenholdt med at grisenes tarme indeholder et stort antal mælkesyrebakterier, er det muligt, at grise vil være en udmærket *in vivo* model til at undersøge probiotiske bakteriers adhæsive egenskaber.

Musemodel til vurdering af probiotiske bakteriers immunmodulerende egenskaber

Projektgruppen har indledt et samarbejde med Mogens Claesson på Institut for Eksperimentel Immunologi på Panum Institutet. Han arbejder med en muse colitis model, hvor mus med medfødt immundefekt (SCID) udvikler colitis. Disse mus skal derfor transplanteres med humane immunologiske celler, og musene kan derved bruges som en *in vivo* model til at undersøge probiotiske stammers immunologiske egenskaber. Ved disse forsøg har vi ved indledende forsøg set, om de to *Lactobacillus*-stammer *L. reuteri* og *L. rhamnosus*, som vi har identificeret og brugt i vores tidligere studier, kan genfindes i fæces under behandling. *L. rhamnosus* er genfundet fra musene. For tiden gennemføres de egentlige forsøg, hvor der endnu ikke foreligger resultater. Hvis resultaterne er af almen interesse vil de blive publiceret i et internationalt tidsskrift.

Identifikation af potentielle probiotiske stammer

Et af projektets mål var at identificere nye lovende mælkesyre- og bifidobakterier, med henblik på senere undersøgelse af bakteriernes adhæsionsevne til tyktarms slimhinden efter indgift til raske voksne. De ti stammer, der er udvalgt til senere afprøvning fremgår af **Tabel 2**. Stammerne består af to mælkesyrebakterier isoleret fra de børn, der indgik i interventionsstudierne under projektet ”Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakterier”. Desuden indgår de to referencestammer, der blev brugt til interventionerne i disse studier, samt en stamme (F19) som Arla Foods gerne vil have testet. De øvrige seks stammer blev identificeret fra nedenstående forsøg.

Mælkesyre- og bifidobakterier der adhærer til tyktarms slimhinden hos raske voksne

Hvis probiotiske bakterier skal være i stand til at kolonisere tarmen, skal disse bakterier kunne adhærere til tarmvæggen (mucosa). Hvorvidt bakterier med potentielt probiotiske egenskaber er adhæsive undersøges i dag oftest i *in vitro* forsøg, men en anden mulighed er, at isolere disse stammer direkte fra tarmvæggen via udtagning af biopsier fra frivillige. Sammensætningen og fordelingen af den bakterielle flora gennem tarmkanalen findes der i dag kun begrænset viden om, men sammensætningen af denne flora, må formodes at spille en vigtig rolle i forhold til probiotiske bakteriers mulighed for at kolonisere tarmen.

Med det dobbelte formål, at isolere nye, adhæsive og potentielt probiotiske stammer og opnå større viden om sammensætningen af den bakterielle flora, herunder specielt mælkesyre- og bifidobakterier, gennem tarmkanalen, blev floraen på biopsier udtaget 3 forskellige steder i

tyktarmen fra 4 frivillige undersøgt ved dyrkningsafhængige såvel som dyrkningsuafhængige metoder.

I den dyrkningsafhængige del af studiet, blev sammensætningen af den bakterielle flora undersøgt ved almindelige pladespredningsteknikker. Udvalgte isolater blev identificeret ved hjælp af sekventering af dele af 16S rDNA. Ydermere blev de probiotiske egenskaber – dvs. antimikrobiel effekt mod *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* og *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, samt evnen til at overleve pH 2,5 og vokse i medie indeholdende galde undersøgt.

I den dyrkningsuafhængige del af studiet blev sammensætningen af den bakterielle flora associeret med tarmvæggen gennem tarmkanalen undersøgt ved hjælp af PCR og DGGE. Udvalgte bånd (se **figur 3**) i DGGE-gelene blev identificeret ved hjælp af sekventering. Via valg af primere ved PCR-reaktionen er det muligt at gøre PCR-DGGE-teknikken specifik for bestemte arter, slægter eller grupper af bakterier. I dette projekt blev brugt primere der amplificerer alle bakteriers rDNA samt primere specifikke for henholdsvis *Lactobacillus* spp. og visse nærtbeslægtede arter (*Weisella*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* og *Pediococcus* spp., herefter omtalt som *Lactobacillus*-lignende) og *Bifidobacterium* spp.

DGGE-profilen repræsenterende *Lactobacillus*-lignende bakterier varierer med både vært og position i tarmen. Bemærkelsesværdigt er det, at *Lactobacillus* spp. kun udgør en mindre del af de identificerede bånd (jvf. **tabel 3**). *Leuconostoc* spp. blev derimod påvist i et flertal af prøverne. I den dyrkningsafhængige del af undersøgelsen, blev det specifikt søgt at isolere *Lactobacillus* spp., hvorfor der ikke i samme grad er overensstemmelse mellem de dyrkningsafhængige og uafhængige resultater her, som i tilfældet med *Bifidobacterium* spp.

DGGE-profilen repræsenterende alle bakterier (data ej vist) viste, at den bakterielle flora varierede med vært, mens der kun var meget begrænset variation med position i tarmen. De identificerede bånd tilhørte hovedsageligt *Bacteroides* og *Prevotella* spp. Endvidere blev *B. bifidum* påvist i prøver fra én forsøgsperson. Dette er i overensstemmelse med resultaterne opnået med *Bifidobacterium*-specifikke primere (jvf. **Figur 3A og tabel 4**).

Undersøgelsen af de probiotiske egenskaber viste, at isolater identificeret som *B. bifidum* hæmmede vækst af patogene bakterier, ligesom de overlevede pH = 2,5 og voksede i substrat indeholdende galde. Tilsvarende gode egenskaber viste et isolat tilhørende *Lactobacillus casei*-gruppen, mens isolater identificeret som *B. longum* ikke hæmmede patogene bakterier, ikke overlevede pH = 2,5 og heller ikke voksede i medie indeholdende galde.

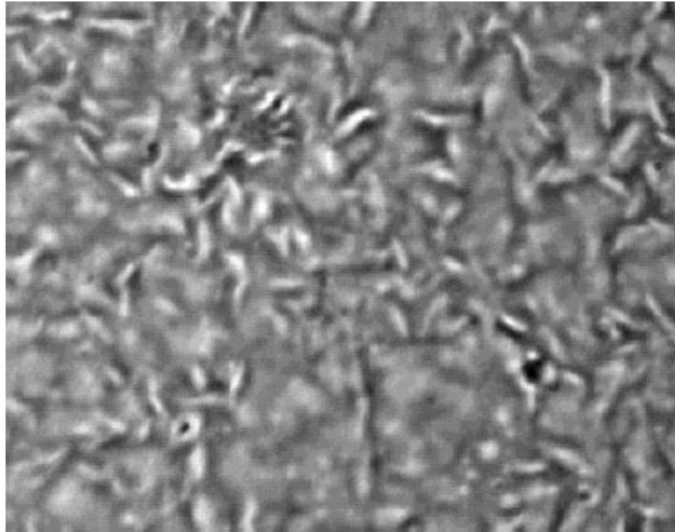
Intervention hos raske voksne mhp. undersøgelse af adhæsion hos raske voksne

De ti udvalgte stammer (tabel 2) vil blive givet til raske forsøgspersoner, der skal til planlagt koloskopi. Det er meningen, at patienterne skal have kapsler med de frysetørrede stammer i en periode på 14 dage op til undersøgelsen. Der er truffet aftale om fremstilling af stammerne hos en svensk producent og undersøgelserne forventes at blive gennemført i løbet af efteråret 2003. Hovedformålet er at se i hvilken udstrækning de udvalgte stammer adhærer til de slimhindebiopsier der udtages i forbindelse med koloskopien.

Figurer og tabeller

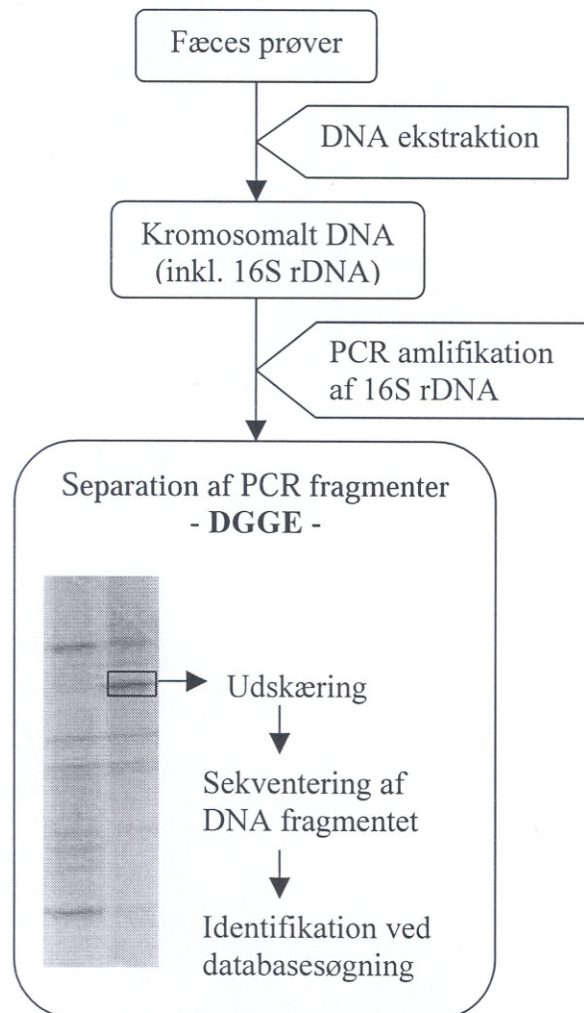
Figur 1.

FISH analyse på biopsi. Billederne viser et snit af en biopsi udtaget fra tyktarmsslimhinden, hvor det øverste billede er fra en almindelig fase-kontrast mikroskopi. Det nederste billede viser det samme snit der er hybridiseret i 16 timer med de to prober EUB-338 (FLUOS) der er en generel bakterie probe med grøn fluorescens og Lab-158 (TAMRA) der er en *Lactobacillus*-specifik probe, med rød fluorescens. Bakteriecellerne på det nederste billede har en gul fluorescens der fremkommer fra en blanding af de to prober, hvilket viser at bakteriecellerne er lactobaciller.



Figur 2.

Analysegang for DGGE (denaturerende gradient gel elektroforese), som er anvendt i indeværende projekt.



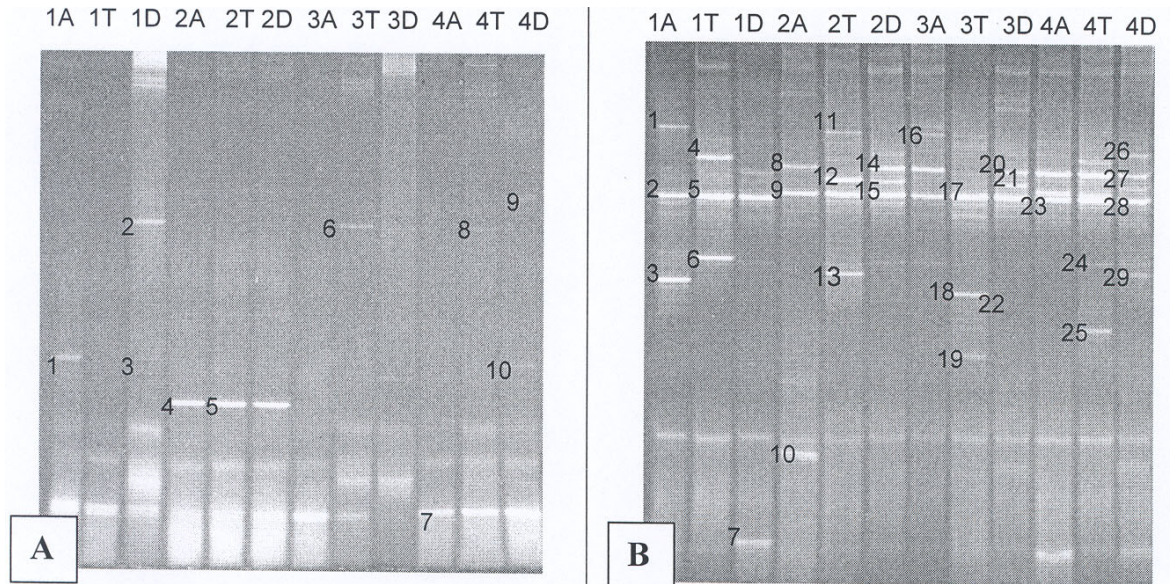
Vi har tidligere haft problemer med at det oprensede DNA fra fæces prøverne indeholdt komponenter der kraftigt hæmmede PCR reaktionen. Dette er blevet løst ved brug af QiaGen stool kit, hvor de hæmmende komponenter fjernes.

Under projektet er der udviklet en metode til specifik påvisning af lactobaciller og bifidobakterier fra prøver af tarmslimhinden og fæces. Ved denne metode bruges specifikke PCR primere til amplificering af disse bakterier som en første PCR reaktion og derefter laves en ny PCR amplificering med generelle primere. En yderligere fordel ved denne metode er, at de bånd fra lactobaciller og bifidobakterier har samme mobilitet i DGGE gelerne som de tilsvarende bakterier har ved brug af kun de generelle primere. Derved er det let at identificere tilstedeværelsen af disse bakterier ud fra profiler af den totale bakterie flora.

Problemer med at sekventere de udskårne bånd fra gelerne er løst ved at farve gelerne med SYBR Gold.

Figur 3.

A) DGGE-profil af *Bifidobacterium* spp. og B) DGGE-profil af *Lactobacillus* spp. og beslægtede mælkesyre bakterier fra biopsier udtaget i den ascenderende (A), transverse (T) og descenderende (D) del af tarmen hos frivillige 1 til 4. Numre henviser til bånd forsøgt identificeret jf. tabel 1 og 2.



Tabel 1.

Fordelingen af identificerede bakterier i nyfødte grise og fra de 7 dage gamle grise. Tallene i tabellen viser hvor mange isolater, der blev identificeret indenfor hver bakterieart.

ITS type/ specie	Nyfødte grise (n=3)			7 dage gamle grise (n=6)		
	Proks tyndtarm	Distal tyndtarm	Colon	Proks tyndtarm	Distal tyndtarm	Colon
A <i>Eubacterium sp</i>	4	6	3			
B <i>Lactococcus lactis</i>	1	1	1	3	1	1
C <i>Enterococcus hirae</i>		2	6	2	2	2
D <i>Weisella paramensenteroides</i>		1	2			3
E <i>Leuconostock citreum</i>	1	1	1			
F <i>Enterococcus hirae</i>		1		1		
G <i>Staphylococcus aureus</i>		2				3
H <i>Weisella confusa</i>		1		16	8	4
I <i>Staphylococcus epidermis</i>	1	2	1	1	3	2
J <i>Propionibacterium acnes</i>		1	1			
K <i>Propionibacterium acnes</i>	1		2			
L <i>Clostridium sp.</i>	1					
M <i>Propionibacterium acnes</i>	1					
N <i>Lactobacillus paraplantarum</i>				1		
O <i>Weisella paramensenteroides</i>				3	5	3
P <i>Lactobacillus reuteri</i>						1
Q <i>Escherichia coli</i>					1	
R <i>Pasteurella aerogenes</i>					1	
S <i>Actinomyces hyovaginalis</i>					1	2
T <i>Streptococcus bovis</i>				1	1	2
U <i>E. coli</i>				4	5	7
V <i>Lactobacillus salivarius</i>				6	7	4
W <i>Lactobacillus sp. oral clone</i>				1		
<i>Salmonella enterica</i>				1		1
<i>Pasteurella aerogenes</i>					1	

Tabel 2. Nye udvalgte stammer til videre probiotiske forsøg

ID	Specie	Oprindelse
D12	<i>Lactobacillus casei</i>	Barn, fæces
E14	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Barn, fæces
Q47	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Voksen, biopsi
Q85	<i>Lactobacillus casei</i>	Voksen, biopsi
Z8	<i>Bifidobacterium longum</i>	Voksen, biopsi
Z9	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Voksen, biopsi
Z11	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Voksen, biopsi
19070-2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Barn, fæses *
12002	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Gris *
F19	<i>Lactobacillus</i>	Arla Foods

* Referencestammer

Tabel 3. Identitet af bånd fra DGGE-analyse af *Lactobacillus*-lignende bakterier

Bånd ¹	Nærmest beslægtede i database ²	% Identity ²
1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	94.5
2	<i>Eubacterium bifforme</i>	99,5
3	<i>Leuconostoc carnosum</i>	97.8
4	<i>Aerococcus viridans</i>	97.2
5	<i>Eubacterium bifforme</i>	99.5
6	<i>Aerococcus rochesterensis / sanguicola</i>	97.3
8	<i>Weisella kimchii / cibaria / confuse</i>	99.5
9	<i>Weisella kimchii / cibaria / confuse</i>	97.8
11	<i>Lactobacillus fermentum</i>	94.5
12	<i>Lactobacillus fermentum</i>	96.8
13	<i>Leuconostoc citrium</i>	98.9
14	<i>Weisella kimchii / cibaria / confuse</i>	99.5
15	<i>Weisella kimchii / cibaria / confusa</i>	98.0
17	<i>Leuconostoc citrium</i>	98.9
19	<i>Leuconostoc citrium</i>	94.6
20	<i>Leuconostoc kimchii</i>	98.8
21	<i>Leuconostoc fallax</i>	99.5
22	<i>Lactobacillus iners</i>	99.4
23	<i>Leuconostoc citrium</i>	98.1
24	<i>Weisella soli</i>	95.1
25	<i>Lactobacillus ruminus</i>	96.2
26	<i>Weisella soli</i>	95.1
27	<i>Leuconostoc kimchii</i>	97.2
28	<i>Leuconostoc citrium / kimchii / pseudomesentorides</i>	98.9
29	<i>Leuconostoc citrium</i>	98.8

¹ Ikke muligt at identificere bånd 7, 10, 16 og 18

² Bestemt som procent identiske nucleotider sammenlignet med sekvenser i NCBI Genbank databasen

Tabel 4. Identitet af bånd fra DGGE-analyse af *Bifidobacterium* spp.

Bånd ¹	Nærmest beslægtede i database ²	% Identitet ²
1	<i>Bifidobacterium longum / infantis</i>	99.4
2	<i>Bifidobacterium adolescentis / ruminatus</i>	99.4
3	<i>Bifidobacterium longum / infantis</i>	98.8
4	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	99.4
5	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	100
8	<i>Bifidobacterium adolescentis / ruminatus</i>	98.8
9	<i>Bifidobacterium adolescentis / ruminatus</i>	99.4
10	<i>Bifidobacterium adolescentis / ruminatus</i>	97.7

¹ Ikke muligt at identificere bånd 6 og 7

² Bestemt som procent identiske nucleotider sammenlignet med sekvenser i NCBI Genbank databasen

Publikationer og offentliggørelser

1. Artikler i internationale tidsskrifter

V Rosenfeldt, KF Michaelsen, M Jakobsen, CN Larsen, PL Møller, P Pedersen, M Tvede, H Weyrehter, NH Valerius, A Pærregaard. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis* 2002;21:411-6.

V Rosenfeldt, KF Michaelsen, M Jakobsen, CN Larsen, PL Møller, M Tvede, H Weyrehter, NH Valerius, A Pærregaard. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis* 2002;21:417-9.

V Rosenfeldt, E Benfeldt, SD Nielsen, KF Michaelsen, DL Jeppesen, NV Valerius, A Pærregaard. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:389-95.

DS Nielsen, PL Møller, V Rosenfeldt, A Pærregaard, KF Michaelsen and M Jakobsen Distribution in the human colon and probiotic properties of mucosa-associated *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria (indsendt til Applied and Environmental Microbiology).

Rosenfeldt V, Pærregaard A, Nexmann Larsen C, Lange Møller P, Tvede M, Sandstroem B, Jakobsen M, Fleischer Michaelsen K: Faecal recovery, mucosal adhesion, gastrointestinal effects and tolerance of mixed cultures of potential probiotic lactobacilli. *Microbial Ecology in Health and Disease*. Accepteret februar 2003.

2. PhD afhandling:

V Rosenfeldt. *Lactobacillus* Strains As Therapeutic Agents in Childhood Infectious and Inflammatory Disorders. Faculty of Health Sciences University of Copenhagen, Denmark. Forfatterforlaget 2000.

3. Indlæg ved faglige kongresser, symposier o.l.

A Pærregaard, V Rosenfeldt Nielsen, CN Jacobsen, PL Møller, KF Michaelsen, B Sandström, M Tvede, M Jakobsen. Identification of probiotic acting Lactobacilli by combined use of *in vitro* and *in vivo* methods. NAPGAN (Nordisk Association for Pædiatrisk GASTroenterologi og Nutrition) møde, Helsinki, 2000.

V Rosenfeldt, A Pærregaard, C Nexman Jacobsen, P Lange Møller, M Tvede, B Sandström, M Jakobsen, KF Michaelsen. Physiological effects of lactic acid bacteria A tolerance - and efficacy study in healthy volunteers. Poster at LMC Centre for Advanced Food Studies congress, Copenhagen January 2000.

A Pærregaard, VR Nielsen, CN Jacobsen, PL Møller, M Jacobsen, B Sandström, M Tvede, KF Michaelsen. Identification of probiotic acting lactobacilli by combined use of *in vitro* methods. World congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Boston, USA, august 2000. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31(2):S253.

V Rosenfeldt, E Benfeldt, KF Michaelsen, NH Valerius, A Pærregaard. Effect of probiotics on small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. Annual Meeting of NAPGAN (Nordic Association for Paediatric Gastroenterology and Nutrition), Helsingør, 30

Sept-1 Oct 2001.

PL Møller, V Rosenfeldt, F Jørgensen, BM Smith, K Holmstrøm, P Stougaard, A Pærregaard, KF Michaelsen, M Jakobsen. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to monitor change in the fecal bacterial composition of children with atopic dermatitis after administration of two *Lactobacillus* strains. Abstract til Bioteknologi Konference, Munkebjerg, Vejle, maj 2001.

F Jørgensen, BM Smith, K Holmstrøm, P Stougaard, PL Møller, KF Michaelsen, M Jakobsen. In vitro methods for evaluation of microbial adhesion in relation to probiotic effect. 1. development of *in situ* methods for probiotic cultures. Abstract til Bioteknologi Konference, Munkebjerg, Vejle, maj 2001.

F Jørgensen, P Stougaard. Bifidobacterial growth on galactooligosaccharides: Development of a method for analysis of complex galactooligosaccharide mixtures in spent medium. Poster til Bioteknologisk Konference, Munkebjerg, Vejle, maj 2001.

A Pærregaard, VR Nielsen, CN Jacobsen, PL Møller, B Sandström, KF Michaelsen, M Tvede. Probiotic spectra of lactic acid bacteria – a multidisciplinary approach to the identification and evaluation of new strains. Abstract til Bioteknologi Konference, Munkebjerg, Vejle, maj 2001.

A Pærregaard, VR Nielsen, CN Jacobsen, PL Møller, M Jacobsen, B Sandström, M Tvede, KF Michaelsen. Probiotic spectra of lactic acid bacteria – a multidisciplinary approach to the identification and evaluation of new strains. LMC Centre for Advanced Food Studies congress, “Future Food - a scientific perspective” - DTU, 16-17 January 2002.

A Pærregaard, V Rosenfeldt, E Benfeldt, NH Valerius, KF Michaelsen. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms in children with atopic dermatitis. ESPGHAN conference, Prag, juni 2003.

4. *Faglige artikler*

KF Michaelsen. Probiotika – bakterier, der fremmer sundheden. *Naturens Verden* 2002:37-41.

VR Nielsen, KF Michaelsen, A Pærregaard. Mælkesyrebakterier og andre probiotiska ved infektiøse og inflammatoriske sygdomme hos børn. Hvad tror vi? - Hvad ved vi? *Ugeskrift for Læger* 2002;164:5769-72.

5. *Mødeindlæg*

M Jakobsen. Indlæg ved møde i Levnedsmiddelskabet (LEVS) under Ingeniørforeningen, 2000.

Forskeruddannelse og gæsterforskere

Vibeke Rosenfeldt havde et Ph.D.-stipendie under det foregående MFF projekt ”Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakteriet”. Hun har afsluttet og forsvaret sin Ph.D.-afhandling (september 2002), under denne projektperiode. Desuden har hun som en del af sine *post doc* arbejder deltaget i flere af studierne i dette projekt.

Som konsekvens af de resultater der er opnået i den aktuelle projekt, er der påbegyndt et Ph.D.-projekt under Mejeri- og Levnedsmiddelinstituttet med titlen “Probiotisk biokonservering af fermenterede kødprodukter”.

Samarbejdsrelationer nationalt og internationalt

Per Sangild, Institut for Husdyrbrug og Husdyrsundhed, KVL: Etablering af grisemodel til vurdering af tidlig kolonisering af mave-tarm kanalen.

Mogens Helweg Claesson, Institut for Eksperimentel Immunologi, Panum Institutet: Etablering af en musemodel til vurdering af probiotiske bakteriers immunmodulerende egenskaber.

Dr. Avrelia Cencic, University of Maribor, Slovenien, etablering af cellemodel til vurdering af probiotiske stammes immunprofil.

Resultaternes praktiske og videnskabelig betydning samt nye problemstillinger

Projektet har udarbejdet metoder, der danner grundlag for en rationel vurdering af kulturers probiotiske egenskaber. Desuden har projektet fremskaffet en række kulturer, som er kandidater til probiotiske kulturer. Projektet har også givet grundlag for det nye samarbejdsprojekt med MFF under Innovationsloven, herunder forsøg på udvikling af en funktionel celle model, som kan erstatte dyremodeller og forudsige effekten hos mennesker.

Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter

Det aktuelle projekt var en videreførelse af et samarbejdet etableret under MFF projektet “Humanfysiologiske effekter af mælkesyrebakterier”. Sammen har de to projekter etableret *in vitro* metoder til at vurdere probiotiske egenskaber, ligesom der er identificeret en række lovende stammer. I det kommende MFF projekt under Innovationsloven, som netop er bevilget, vil det tværvideenskabelige samarbejde blive videreført mhp en yderligere testing af 50 lactobaciller og bifidobakterie stammer, der også vil omfatte en *in vitro* testing af stammernes immunologiske profil, samt afprøvning i humane modeller. Projektet har titlen: ”Probiotiske bakterier; belysning af interaktioner med det cellulære immunsystem, stimulering af tarmepitelets forsvarsmekanismer og gavnlige indvirkning på sprædbørns immunstatus, tarmslimhinde og dermed sundhed”.

