

EESTI VABARIIK
PATENDIAMET

(11) EE 201800005 A

(51) Int.Cl.
A61K 35/747 (2018.01)
A23L 33/135 (2018.01)
A61P 1/12 (2018.01)

(12) PATENDITAOTLUS

(21) Patenditaotluse number:	P201800005	(71) Patenditaotleja:	BioCC OÜ Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE
(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev:	31.10.2014	(72) Leiutise autorid:	Marika Mikelsaar Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE Merle Rätsep Alasi 31-49, 50109 Tartu, EE Pirje Hütt Kulli 10-2, 50416 Tartu, EE Imbi Smidt Nõo vald, 61622 Tartu maakond, EE Kai Truusalu Vanemuise 45-59, 50107 Tartu, EE Epp Sepp Kaarli pst 11-47, 10119 Tallinn, EE Raik-Hiio Mikelsaar Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE Kalle Kilk Suur-Kaar 21-3, 50404 Tartu, EE Jelena Stsepetova Muru 12-28, 50707 Tartu, EE Siiri Kõljalg Elva 6, 50404 Tartu, EE Mirjam Vallas Ravila 76-34, 50408 Tartu, EE
(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev:	16.07.2018		
(30) Prioriteediandmed:	03.04.2014 US 244284		
(62) Varasema patenditaotluse, millest patenditaotlus on eraldatud, esitamise kuupäev ja number:	31.10.2014 P201400038		
(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed:	DSM 21379 16.04.2008 DSMZ	(74) Patendivolinik:	Sirje Kahu Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE

(54) Probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsioon kasutamiseks *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks

(57) Leiutis käsitleb probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379, mida saab kasutada antimikroobse agendina endogeenset ja/või eksogeenset päritolu *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks *C. difficile* eoste germinatsiooni takistamise ja *C. difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemise allasurumise teel. *L. plantarum* Inducia sobib kasutamiseks samaaegselt antibiootikumiraviga. Tüve *L. plantarum* Inducia sisaldavad *C. difficile* vastased kompositsioonid võivad lisaks sisaldada ka ksülitooli.

(57) The invention relates to probiotic microorganism strain *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 which can be used as an antimicrobial agent in lowering the risk of *Clostridium difficile* associated diarrhoea (CDAD) of endogenous or exogenous origin by preventing germination of *C. difficile* spores and by suppressing proliferation of *C. difficile* vegetative cells. *L. plantarum* Inducia can be used simultaneously with antibiotic treatment. The compositions against *C. difficile* may further comprise xylitol.

PROBIOOTILIST MIKROORGANISMI TÜVE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* INDUCIA DSM 21379 SISALDAV KOMPOSITSIOON KASUTAMISEKS *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* PÕHJUSTATUD KÕHULAHTISUSE (CDAD) RISKI VÄHENDAMISEKS

5 TEHNIKAVALDKOND

Käesolev leiutis kuulub mikrobioloogia ja toitumise valdkonda ning käsitleb tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM21379, millel on mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi.

TEHNIKA TASE

Probiootikum

- 10 Probiootikum on elus mikrobiaalne toidu komponent, millel on piisavates doosides manustatuna kasulikud omadused inimese tervisele (Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf> Retrieved 14.03.2014).

- Probiootilise tootena mõistetakse kindlat tüve sisaldavat preparaati, mis toimib
- 15 peremeesorganismi mitmetele funktsioonidele (antiinfektsioossed, morfoloogilised, immunoloogilised, metaboolsed) eesmärgiga soodsalt mõjutada tervist kas füsioloogilise aktiivsuse toetamise või haiguste riski vähendamise kaudu. On üldtunnustatud, et sama liigi piires võivad erinevatel tüvedel olla erinevad probiootilised omadused (Ouweland, A. C., Salminen, S., Isolauri, E., Probiotics: an overview of
- 20 beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek. 2002: 82, 279-289; Ljungh, A., Wadström, T., Lactic acid bacteria as probiotics. Curr Issues Intest Microbiol. 2006: 7, 73-89).

- Levinumad probiootilised mikroobid kuuluvad perekondadesse *Bifidobacteria* ja *Lactobacillus*. Probiootilisi mikroobe manustatakse tavapäraselt fermenteeritud
- 25 piimatoodetega, nagu jogurt, keefir, juust, või toidulisanditena. Käärsoole mikrofloora on tasakaalustatud ja soole limaskesta mikrofloora ei muutu kergesti. Siiski, piisavates doosides (päevane doos vähemalt 10^9 PMÜ) manustamine võimaldab demonstreerida probiootikumi toimet.

- Probiootikumide terapeutiline eesmärk on vähendada või elimineerida potentsiaalseid
- 30 patogeene ja toksine, sünteesida toitaineid, antioksidante, kasvufaktoreid, stimuleerida soole motoorikat ja moduleerida kaasasündinud ja adaptiivset immuunsust.

Lactobacillus plantarum on looduses laialt levinud, leidudes fermenteeritud taimsel materjalil, piima- ja lihatoodetes ja samuti inimese soolestikus (Hammes, W. P., Weiss, N. and Hertel, K. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes. 2006: 4:320–403).

- 5 Liigi *L. plantarum* tüved on saadaval probiootilise toidulisandina (*L. plantarum* 299v, DSM 9843, Probi AB, Sweden) ja kuuluvad samuti eri tüvesid sisaldava toidulisandi VSL#3 koostisesse (*L. plantarum* 299v, DSM 9843, Probi AB, Sweden).

- Tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 on kirjeldatud kui antimikroobset peptiidi plantariitsini tootva, tsütokiin IL-6 indutseeriva, putressiini tootva ja soole
10 lümfikudet, loomuliku rakulist immuunsust ja soole limaskestast kaitsebarjääri parandava probiootikumina (Mikelsaar *et al.*, EP2288360B1, 2009, Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus OÜ).

Soolestiku häiritud mikrobialökoloogia

- Seedetrakti mikrofloorat võivad tugevasti tasakaalust välja viia laia toimespektriga
15 antibiootikumide kasutamine infektsioonide raviks ja põletiku komplikatsioonid.

Clostridium difficile infektsioon

- Clostridium difficile* tuvastati 1970-ndatel aastatel kui antibiootikumi-seoselise kõhulahtisuse tekitaja. Eoseid moodustav, anaeroobne soolestiku patogeen *Clostridium difficile* on levinud haiglates ja vanadekodudes (Britton, R. A., Young, V. B.,
20 Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. Trends Microbiol. 2012; 20, 313-319). Eksogeenset päritolu *C. difficile* infektsiooni põhjuseks on nakatumine *C. difficile* eostega. Haiguse põhjustavad mitte eosed, vaid vegetatiivsete rakkude toodetud toksiidid. Endosporide moodustamine on oluline mikroobi põhjustatud haiguse levikul. Haiguse esile
25 kutsumiseks on vajalik spooride germinatsioon ja vegetatiivsete rakkude kasv (Burns D. A., Heap J. T. Minton N. P. *Clostridium difficile* spore germination: an update. Res Microbiol. 2010;161(9):730-4).

- C. difficile* infektsiooniga patsientidest veerandil (25 protsendil) kujuneb välja
30 pseudomembranoosne koliit (PMK). *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisus (CDAD, *Clostridium difficile* associated diarrhea) suurendab suremust, voodipäevade arvu ja suurendab oluliselt kulutusi üldistele tervishoiuteenustele. Tänapäevani rõhutavad

ravijuhised vankomütsiini kasutust mõõduka ja raske pseudomembranoosse koliidi puhul (<http://www.uptodate.com/contents/clostridium-difficile-in-adults-treatment>, alla laaditud 14.03.2014).

Clostridium difficile infektsioon kordub umbes 20 protsendil patsientidest ja tõuseb 40 kuni 60 protsendini järgnevate retsidiivide korral (Kelly, C. P., LaMont, J. T., *Clostridium difficile* - more difficult than ever. N Engl J Med. 2008: 359, 1932-1940). Antibiootikumravi rikub kompleksse ja tasakaalustatud mikroorganismide mitmekesisuse, mis on peamine faktor haiguse patogeneesis, *Clostridium difficile* kolonisatsioonis ja endogeenset päritolu haigestumisel. Korduvate *C. difficile* infektsioonidega CDI (*Clostridium difficile* infection) patsientide soolefloora mitmekesisus on oluliselt vähenenud võrreldes kontrollgrupiga (Chang, J. Y., Antonopoulos, D. A., Kalra, A., Tonelli, A., Khalife, W. T., Schmidt, T. M., Young, V. B. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *C. difficile*-associated diarrhea. J Infect Dis. 2008: 197, 435-438). Mikroobide mitmekesisuse säilitamine ja taastamine võimaldaks luua uusi strateegiaid. Otsustava tähtsusega selle haiguse ennetamises ja ravis on leida võimalus antibiootikumravi käigus ja foonil teisenenud mikrofloora taastamiseks eri raviskeemide abil, sh probiootikumide manustamisega. Enamik probiootikume koloniseerivad soolestiku ajutiselt, toodavad bakteritsiidseid happeid ja peptiide ning edendavad mikroobide omavahelist võitlust, võideldes toitainete ja epiteelile kinnitumise eest. Need mõjutused tunduvad vähendavat keskkonna sobilikkust *C. difficile* jaoks. Eelnevad uuringud soovivad CDI ennetamiseks kasutada probiootikumide kombinatsioone, mis sisaldavad liike *L. acidophilus* ja *L. casei*, *S. boulardii* või *L. rhamnosus*. Doosid, mis on suuremad kui 10⁹ PMÜ/päevas, on efektiivsemad kui madalamad doosid.

Probiootikumide antimikroobset aktiivsust on pakutud üheks mehhanismiks *C. difficile*-ga võitlemisel. Piimhappebakterid toodavad lühikese ahelaga rasvhappeid, mis alandavad soolestiku pH-d ja takistavad *C. difficile* kinnitumist (McFarland, L. V., Beneda, H. W., Clarridge, J. E., Raugi, G. J. Implications of the changing face of *C. difficile* disease for health care practitioners. Am J Infect Control. 2007: 35, 237-253). Probiootikumide teine võimalus kaitsta soolestiku barjäärifunktsiooni võib olla *C. difficile* A ja B toksiinide seondumise takistamine ja seeläbi soole epiteelile pseudomembraanide tekke takistamine.

Samas ei oma kõik probiootikumid eelpoolmainitud mehhanisme.

Laktobatsillide tüvespetsiifilisus on oluline faktor, mida tuleb arvestada *C. difficile* infektsiooni profülaktikaks ja raviks uute potentsiaalsete probiootikumide otsimisel (Tejero-Sariñena S., Barlow J., Costabile A, Gibson G. R., Rowland I. Antipathogenic activity of probiotics against Salmonella Typhimurium and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: Is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? Anaerobe. 2013: 24; 60-65).

Veelgi enam, mõned kliinilised uuringud pole suutnud anda statistiliselt piisavaid tõendeid tõestamaks teatud probiootikumide efektiivsust CDAD ennetamiseks. Suures randomiseeritud kliinilises katses, mis hõlmas 2941 antibiootikumravi saavat eakat, ei leidnud katse läbiviijad CDI riski vähenemist probiootikumi (*Lactobacillus acidophilus* ja *Bifidobacterium bifidum* segu) saavate eakate hulgas võrreldes kontrollgrupiga (RR 0.71; 95% CI 0.34-1.47; p =0.35) (Allen, S. J., Wareham, K., Wang, D., Bradley, C., Hutchings, H., Harris, W., Dhar, A., Brown, H., Foden, A., Gravenor, M. B., Mack, D. Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. Lancet. 2013: 382, 1249-1257). Pärast aastaid kestnud kliinilistes uuringutes erinevate probiootikumide toime uurimist CDI ravis on endiselt arutluse all probiootikumi tüve, doosi ja toime kasutamine raviskeemis (Naaber, P., Mikelsaar, M., Interactions between Lactobacilli and antibiotic-associated diarrhea. Adv Appl Microbiol. 2004: 54 231-260).

Ksülitooli kasutamine

Ksülitool on 5-C suhkrualkohol, pentitool ja seda leidub taimedes, seentes ja algloomades. Ksülitool on oluline imetajate süsivesikute metabolismi vaheprodukt, näiteks inimveri sisaldab kuni 8×10^{-5} M ksülitooli.

Manustatud ksülitool ei absorbeeru täielikult ja imendumata osa saab kasutada kiudainena bakteriaalsel fermentatsioonil muutes ksülitooli lühikese ahelaga rasvhapeteks, mida kasutatakse energeetilistes radades. Ksülitool mõjutab mõnede mikrofloora liikide kasvu jämesooles, soodustades indigeense mikrofloora kasvu ja aktiivsust. Üks gramm ksülitooli sisaldab 2,4 kcal, võrreldes glükoosiga, mis sisaldab 3,87 kcal ühes grammis. Ksülitooli reklaamitakse kui "ohutut" diabeetikutele ja hüperglükeemiat põdevatele isikutele (Talbot J. M., Fisher K. P., The Need for Special

Foods and Sugar Substitutes by Individuals with Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1978; 1; 231-240).

- Varasemates uuringutes oleme leidnud, et 1 protsendi ksülitooli lisamine kasvukeskkonda takistas *Clostridium difficile* VPI 10463 vegetatiivsete rakkude kinnitumist CACO-2 rakkudele, tõenäoliselt blokeerides rakul olevad retseptorid. Hamstri mudelisse kohaldatuna (Naaber, P., Lehto, E., Salminen, S., Mikelsaar, M., Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996: 14, 205-209) kaitses 1 ml 20 protsendilise ksülitooli ja *Lactobacillus rhamnosus* GG lahuse manustamine loomi raske enterokoliidi tekkimise vastu (Naaber, P., Lehto, E., Salminen, S., Mikelsaar, M., Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996: 14, 205-209). Nendes katsetes, kus kasutati ksülitooli ja probiootikumi *Lactobacillus rhamnosus* GG kombinatsiooni, nakatati rakukultuuri ja hamstreid eelnevalt anaeroobsetes tingimustes kultiveeritud *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkudega.
- Kliinilises praktikas (meditsiinasutustes) või vanadekodudes aga areneb haigus nakatumisel aeroobsetele tingimustele ülimalt vastupidavate *C. difficile* eostega. Eoste germinatsioon toimub peremeesorganismis.
- Mõned autorid on väitnud, et loomudelites võivad mõningad suhkrud sarnaselt glükoosile blokeerida *C. difficile* A ja B toksiinide ekspressiooni (Karlsson, S., Burman, L. G., Akerlund, T. Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. Microbiology. 2008: 154, 3430-3436).

Seega on endiselt vajadus leida probiootilisi tüvesid, mis efektiivselt vähendavad *Clostridium difficile* nakatumise riski.

LEIUTISE OLEMUS

- Leiutise eesmärk on pakkuda tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsioon kasutamiseks antimikroobse agendina endogeenset ja/või eksogeenset päritolu *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni takistamise ja *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemise allasurumise teel. *L. plantarum* Inducia on kasutatav samaaegselt antibiootikumraviga.
- Clostridium difficile* vastased kompositsioonid võivad lisaks sisaldada ka ksülitooli.

L. plantarum Inducia sisaldavaid kompositsioone saab kasutada toiduainete, toidulisandite, farmaatsia- või veterinaartoodete tootmiseks. Toiduained võivad olla piima- või lihatooted, maiustused jne. Piimatooted võivad olla hapendatud piimatooted, juust, jogurt jne.

5

Toidulisandit võib kasutada pulbrina (kapslid, pastillid, tabletid, pulbrikotikesed jne) või vedelal (ampullid) kujul. Tüve võib kasutada ka külmuivatatuna.

Tüve *L. plantarum* Inducia DSM 21379 efektiivne doos on vahemikus 1×10^9 PMÜ kuni 1×10^{10} PMÜ, soovitatavalt 5×10^9 PMÜ päevas.

10 JOONISTE LOETELU

Fig 1 keskkonna pH väärtused tüve *L. plantarum* Inducia sisaldavas ksülitooli lisandiga ja modifitseeritud MRS kontrollsöötmes mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas.

Fig 2 toksiinide A ja B geenide olemasolu tüvel *C. difficile* VPI 10643 määratuna pöördtranskriptsiooni (RT) ja reaalaja PCR amplifikatsiooniga (qPCR).

- 15 Fig 3 toksiin B geeni esinemine ampitsilliini ja *C. difficile* mõjutatud hamstri peensooles ja maksas määratuna pöördtranskriptsiooni (RT) ja reaalaja PCR amplifikatsiooni (qPCR) meetodiga.

Fig 4a jämesoole normaalne limaskest pärast probiootikumi manustamist.

Fig 4b jämesoole *C. difficile* infektsiooniga limaskest.

- 20 Fig 5a eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüperemia peensooles.

Fig 5b eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüperemia jämesooles ja intensiivne punetus.

- Fig 5c eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüperemia kõhunäärmes.

- 25 Fig 5d eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüperemia põrnas.

Fig 5e eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused Pseudomembraanid peensooles.

- 30 Fig 5f eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. PMN infiltratsioon pseudomembraanidega jämesooles.

LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

Leiutist illustreerivad järgnevad näited, mis ei piira leiutise ulatust.

Tüve *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamine antimikroobse agendina, *C. difficile* spooride germinatsiooni ja vegetatiivsete rakkude proliferatsiooni takistajana

- 5 Näide 1. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistlik aktiivsus *C. difficile* vegetatiivsete rakkude vastu anaeroobses keskkonnas *in vitro*

Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistlikku aktiivsust *C. difficile* tüvede vastu anaeroobses keskkonnas.

- 10 Meetodid. Testitud tüved: *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* VPI 10463 (ATCC 43255), hüpervirulentne tüvi M 13042.

Mikroobitüved külvati tahkele söötmele ning inkubeeriti anaeroobses keskkonnas. Füsioloogilises lahuses tehti mikroobide suspensiooni vastavalt MacFarlandi standardile 3 (10^8 PMÜ/ml). 200 ml BHI söödet inokuleeriti nimetatud suspensiooniga (0,2 ml)

- 15 saavutamaks lõpp-kontsentratsiooni 10^5 PMÜ/ml.

Eri ajahetkedel tehti bakterioloogilised väljakülvid (0,1 ml) MRS ja LAB160 söötmetele. Väljakülve inkubeeriti paralleelselt anaeroobses ja mikroaeroobses keskkonnas. Kasvu hinnati 2-5 päeva pärast ja tulemused väljendati log₁₀ PMÜ/ml.

Tabel 1. *C. difficile* referentstüvede vegetatiivsete rakkude proliferatsiooni pidurdus

- 20 kooskultiveerimisel tüvega *L. plantarum* Inducia DSM 21379 0, 24, pärast 48 tundi

	kasv (log PMÜ/ml)		
	0 h	24 h	48h
Monokultuuri proliferatsioon BHI söötmes			
<i>L. plantarum</i> Inducia	5,3	8,0	6,3
	5,8	4,6	7,5
Kliiniline referentstüvi M 13042	5,3	5,3	7,5
<i>L. plantarum</i> Inducia ja <i>C. difficile</i> vegetatiivsete rakkude proliferatsioon kooskultiveerimisel BHI söötmes	0 h	24 h	48 h
<i>L. plantarum</i> Inducia koos tüvega <i>C. difficile</i> VPI	5,8	8,8	7,3
<i>L. plantarum</i> Inducia koos referentstüvega M	5,6	8,5	6,0
<i>C. difficile</i> VPI10463 koos tüvega <i>L. plantarum</i> Inducia	5,5	0	0
<i>C. difficile</i> M 13042 koos tüvega <i>L. plantarum</i> Inducia	5,3	0	0

C. difficile vegetatiivsete rakkude täielik inhibeerimine BHI söötmes *L. plantarum* Inducia DSM 21379 poolt ilmnes pärast 48-tunnist inkubatsiooni mikroobide elulemuse kontrollväljakülvide selektiivsetele söötmetele MRS ja LAB160. Suurim *L. plantarum* Inducia DSM 21379 tihedus BHI söötmes oli pärast 24-tunnist inkubatsiooni. *L.*
 5 *plantrum* Inducia DSM 21379 hulk pärast 48-tunnist inkubatsiooni mõnevõrra langes nii monoklutaaris (6.3 log PMÜ/g) kui kombinatsioonis *C. difficile* 'ga (7.3 ja 6.0 log PMÜ/g) (tabel 1).

Näide 2. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 supernatandi mõju *Clostridium difficile* referents- ja kliiniliste tüvede vegetatiivsetele rakkudele

10 Antud *in vitro* katse eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antimikroobset toimet *C. difficile* referents- ja kliinilisest materjalist isoleeritud tüvede (kliiniliste tüvede) vegetatiivsetele rakkudele. Naturaalse (happelise) ja neutraliseeritud (antimikroobsed ained, nt peptiidid) supernatandi toime eristamine võimaldab hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistliku aktiivsuse erinevaid mehhanisme - kas
 15 toimivad pigem orgaanilised happed või bakteriotsiinid.

Materjal (tüved) (tabel 2)

L. plantarum Inducia DSM 21379

Clostridium difficile referentstüved VPI 10463 ja M 13042

20 *Clostridium difficile* kliinilised isolaadid (11 tüve)

Meetodid. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 supernatandi antimikroobset toimet testiti *C. difficile* referents- ja kliiniliste tüvede suhtes mikrotiiterplaatidel (MTP).

L. plantarum Inducia DSM 21379 säilitati -80 °C klaaskuulikestega mikrokatsutites ja
 25 aktiveerimiseks kultiveeriti 3x0,15 protsendilise agari lisandiga MRS puljongis ning inkubeeriti mikroaeroobses keskkonnas (10-protsendiline CO₂) temperatuuril 37 °C 24 tundi. BHI puljongi inokuleerimiseks kasutati üleöö kasvanud *L. plantarum* Inducia DSM 21379, mida lisati BHI puljongile 1 protsent v/v ja suspensiooni inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes 24 tundi. Supernatandi antimikroobse aktiivsuse
 30 hindamiseks tsentrifuugiti 24 tunni vanust suspensiooni ning eraldati supernatant. Mõõdeti supernatandi pH ja supernatant jagati kaheks osaks. Üks osa supernatandist jäeti naturaalselt happeliseks ja teine osa neutraliseeriti 6N NaOH-ga kuni pH

väärtuseni 6,0 ning mõlemad supernatandid filtersteriliseeriti.

5 *C. difficile* tüvesid säilitati -80 °C klaaskuulikestega mikrokatsutites ja aktiveerimiseks külvati 3x hobusevere lisandiga *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) söötmele ja inkubeeriti anaeroobses keskkonnas (anaeroobne käsiboks, gaasisegu 90% N:5% CO₂:5% H₂) 24 tundi. Üleöö kasvanud *C. difficile* kultuuri kasutati suspensiooni tegemiseks, mis vastas tihedusele Mac Farland 3,0. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antimikroobse aktiivsuse hindamiseks tehti järgmised katsesegud: 20 µl *C. difficile* rakususpensioonile lisati 180 µl: (1) steriilne BHI puljong (kontroll), (2) rakuvaba BHI
10 supernatant, (3) rakuvaba neutraliseeritud supernatant, (4) lahjendatud rakuvaba supernatant (1:1 steriilses BHI puljongis) ja (5) lahjendatud neutraliseeritud rakuvaba supernatant (1:1 steriilses BHI puljongis).

15 *C. difficile* kasvu (optilise tiheduse väärtuse muutus) hinnati pärast 48 tunni inkubatsiooni, optiline tihedus mõõdeti MTP lugejaga OD_{620nm} juures ning seejärel arvutati kasvumuutus.

L. plantarum Inducia DSM 2137 inhibeerivat toimet hinnati Kruskal-Wallise testiga, kus *C. difficile* kasvutihedust (OD_{620nm}) kontrollsöötmes võrreldi *C. difficile* kasvu
20 tihedusega loodusliku ja neutraliseeritud supernatandis. Statistiliste andmete analüüsiks kasutati PAST Statistics veebipõhist programmi.

Tabel .2. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 naturaalse ja neutraliseeritud supernatandi ja lahjendatud supernatandi antimikroobne aktiivsus *C. difficile* referents- ja kliiniliste tüvede suhtes 48-tunnise inkubatsiooni järel

<i>C. difficile</i> tüved	<i>C. difficile</i> tihedus BHI puljongis (kontroll)	<i>C. difficile</i> tihedus <i>L. plantarum</i> Inducia supernatandis (naturaalne või neutraliseeritud)		<i>C. difficile</i> tihedus <i>L. plantarum</i> Inducia 1:1 lahjendatud supernatandis (supernatant: BHI puljong) (naturaalne või neutraliseeritud)	
		Naturaalne	Neutraliseeritud	naturaalne	neutraliseeritud
CDE	0,259	0,023	0,150	0,113	0,395
CDP1	0,478	0,007	0,305	-0,007	0,294
CDP2	0,510	0,001	0,550	0,193	0,651
CDP3	0,493	0,009	0,363	0,114	0,334
CDP4	0,386	0,004	0,247	0,084	0,343
CDP5	0,311	0,003	0,192	0,097	0,369
CDP6	0,503	0,003	0,208	0,107	0,264
CDP7	0,402	0,091	0,315	0,126	0,325
CDP8	0,110	0,002	0,170	0,019	0,316
CDP9	0,090	0,032	0,170	0,103	0,334
CDP10	0,209	0,023	0,050	0,093	0,331
VPI 10643	0,420	0,044	0,076	0,329	0,290
M 13042	0,402	0,005	0,249	0,083	0,304
Mean ± SD	0,352±0,15 ^{a,b} ;c	0,019±0,03 ^{a,d,e,f}	0,234±0,13 ^b ;d	0,112±0,08 ^c ;e	0,350±0,10 ^f

^a p<0,0001; ^b p<0,05; ^c p<0,01; ^d p<0,001; ^e p<0,01; ^f p<0,001

- 5 Kliinilisest materjalist isoleeritud tüved: *C. difficile* CDE, CDP 1-9; referentstüved: *C. difficile* VPI 10463 (ATCC 43255) ja *C. difficile* M13042 (Kanadas isoleeritud ribotüübi O27 pandeemiline tüvi).

Seega, *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antimikroobne aktiivsus on tingitud nii happe

produktisioonist naturaalses tootes (pH alandamine) ja väiksemas hulgas antimikroobsete peptiidsete ühendite tootmisest, mis on aktiivsed ka peale supernatandi neutraliseerimist (tabel 2).

Näide 3. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvu ja pH väärtuste testimine ksülitooliga söötmes kultiveerimisel

Katse eesmärk oli hinnata, kas ksülitool mõjutab *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistlikku aktiivsust *C. difficile* vastu.

L. plantarum Inducia (10^5 CFU/ml) inkubeeriti MRS söötmes, milles glükoos oli asendatud 5 protsendilise ksülitooliga või ei kasutatud suhkrut üldse, mikroaeroobses või anaeroobses keskkonnas. Laktobatsillide hulk loendati ja avaldati PMÜ/ml söötme kohta. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ksülitooli kasutamist kontrolliti 2-, 6-, 24- ja 48-tunnise inkubatsiooni järel.

L. plantarum Inducia DSM 21379 kasvas 24 tunni jooksul võrdselt nii 5-protsendilise ksülitooli lisandiga kui ilma ksülitoolita söötmes. 5-protsendilise ksülitooli lisandiga söötmes oli *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasv tihedam mikroaeroobses keskkonnas võrreldes anaeroobse keskkonnaga, milles oli kasv 2 log madalam (tabel 3).

Tabel 3. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 hulk (log PMÜ/ml) protsendilise ksülitooli või glükoosi lisandiga MRS söötmes, kultiveerimisel mikroaeroobses või anaeroobses keskkonnas

Kasvu tingimused	Söötmesse lisatud suhkur	<i>L. plantarum</i> (log PMÜ/ml) hulk erinevates inkubatsiooni ajapunktides				
		0	2h	6 h	24 h	48 h
Mikroaeroobne	ksülitool	5,6	5,60	6,24	8,0	7,2
	glükoos	5,41	5,48	6,94	8,8	9,0
Anaeroobne	ksülitool	5,6	5,70	6,00	7,4	7,15
	glükoos	5,41	5,70	6,96	9,1	9,1

See katse tõestas, et *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ei kasuta MRS söötmesse lisatud ksülitooli efektiivselt. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvatamisel modifitseeritud MRS söötmes mõõdeti pH langust. Glükoosiga kontrollsöötmes oli orgaaniliste hapete tootmisest tingitud pH madalam anaeroobses keskkonnas. pH langes ksülitooli sisaldavas söötmes väärtuselt 6,2 väärtuseni 5,0 nii mikroaeroobses kui anaeroobses

keskkonnas, kuid jäi tunduvalt madalamaks võrreldes glükoosi sisaldava kontrollsöötmega, milles pH langes väärtuselt 7,5 väärtuseni 3,2 (joonis fig 1).

Ksülitooli metaboliseerimine *L. plantarum* Inducia DSM 21379 poolt.

Uuringu eesmärk oli mõõta ksülitooli kasutamist *L. plantarum* Inducia DSM 21379 mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas.

Meetodid: *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvatati mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas 5% ksülitooli lisandiga söötmes 2 kuni 120 tundi. Viidi läbi kaks paralleelkatset. Ksülitooli detekteerimiseks kasutati mass-spektromeetrit QTRAP 3200 (Applied Biosystems, USA). Proove tsentrifuugiti 3 minutit 10 000 g, tehti 100x lahjendus ja 50 µl segati 50 µl sisemise standardiga (5 mM D4 merevaikhape atsetonitriilis, 50 µl). Mass-spektromeetrisse süstiti 5 µl lahjendust, milles kasutati 50-protsendilist atsetonitriil/vee segu. Substraadid, ioonipaariid 151/101 (ksülitool) ja 121/77 (sisemine standard) tuvastati mitmekordse reaktsiooni monitoorimisel (MRM). Kontsentratsioon arvutati kaubandusliku ksülitooli (Sigma-Aldrich, Saksamaa) kindla kontsentratsiooniga lahuste kalibreerimiskõvera alusel.

Korduskatsetes selgus, et *L. plantarum* Inducia kasutas ksülitooli väga väikeses koguses, suhkrul hulk söötmes püsis algväärtuse lähedane, muutus oli 0-0,6 mM (tabel 4).

Tabel 4. Ksülitooli hulk (mM) pärast tüvega *L. plantarum* Inducia DSM 21379 inkubeerimist 5 protsendilise ksülitooli lisandiga söötmes 120 tunni jooksul, mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas

Ksülitool (mM)	Korduskatsed	0 h	2 h	6 h	24 h	48 h	120 h
5% ksülitooli, mikroaeroobne	I	3,1	ND	3,2	2,5	3,2	ND
	II	3,4	3,4	3,3	3,2	3,3	3,3
5% ksülitooli, anaeroobne	I	3,1	ND	2,8	3,2	2,5	ND
	II	3,4	3,4	3,2	3,2	3,3	3,5

ND – ei tuvastatud

Seega mass-spektromeetri analüüs kinnitas, et *L. plantarum* Inducia kasutab ksülitooli väga väheses koguses.

C. difficile referentstüvede kasv ksülitooli ja ampitsilliini sisaldavas söötmes.

Uuringu eesmärgiks oli jäljendada soolestiku keskkonda *in vitro* katses Süüria

hamstritel välja töötatud *C. difficile* infektsiooni mudeliga sarnaselt.

Ksülitooli ja ampitsilliini mõju *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvede (VPI 10463 ja hüpertoksiline tüvi M 13042, ribotüüp O27) kasvule testiti BHI söötmes *in vitro*.

- 5 Tabel 5. Eri ksülitooli (0,1-5-protsendilise) ja ampitsilliini (0,75 µl/ml) kontsentratsioonide toime 48 tunni jooksul *Clostridium difficile* ja *L. plantarum* Inducia DSM 21379 monokultuuride kasvule anaeroobses keskkonnas ja BHI söötmes

Eksperimen- taalsed modulaatorid	<i>L. plantarum</i> Inducia log PMÜ/g		<i>C. difficile</i> VPI log PMÜ/g		<i>C.difficile</i> M log PMÜ/g	
	0 h	48 h	0 h	48	0 h	48 h
BHI kontroll	5,9	9,8	5,3	7,2	4,9	7,1
0,1% ksülitool	5,3	8,0	4,7	6,4	5,0	6,9
1 % ksülitool	5,0	8,0	5,5	7,3	4,8	6,7
2,5% ksülitool	5,5	8,3	5,0	6,7	5,0	6,0
5 % ksülitool	5,5	7,8	5,0	7,1	5,0	6,7
Ampicillin 0,75 µl/ml	5,3	7,1	5,8	7,0	4,7	7,0

L. plantarum Inducia DSM 21379 ja kahe *C. difficile* referentstüve hulk tõusis BHI puljongis (kontroll) peaaegu 2 kuni 4 logaritmi 48 tunni pikkuse inkubatsiooni järel.

- 10 Ksülitooli ja ampitsilliini lisamine ei mõjutanud *C. difficile* tüvede elulemust (Tabel 5).
L. plantarum Inducia DSM 21379 kasv oli alla surutud ca 2 logaritmi võrra nii 5-protsendilise ksülitooli kui 0,75 µl/ml ampitsilliini lisamisel. Seega antibiootikumi ja kuni 5-protsendilise ksülitooli lahuse manustamisel on *L. plantarum* Inducia elulemus soolestiku mikrokeskkonnas tagatud.
- 15 Näide 4. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C.difficile* referentstüvede elulemus kooskultiveerimisel, ksülitooli ja ampitsilliini erinevatel kontsentratsioonidel.
 Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvede elulemust kooskultiveerimisel ksülitooli ja ampitsilliini erinevate kontsentratsioonide juures.
- 20 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvedega inokuleeriti 5-protsendilise ksülitooli ja 0,75 µl/ml ampitsilliini lisandiga BHI sööde ja inkubeeriti anaeroobses keskkonnas (aneroobne box Concept 400, UK) 24 ja 48 tundi. *L. plantarum* Inducia DSM 21379, *C.difficile* referentstüvede VPI ja M elulemust peale

kooskultiveerimist kontrolliti monokultuurina 5 protsendilise ksülitooli ja ampitsilliini lisandiga BHI söötmes (1, 2a, 2b).

Uuritavate mikroobide hulga määramiseks tehti kümnendlahjendused. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 külvati MRS söötmele ja inkubeeriti mikroaeroobses keskkonnas ning *C. difficile* külvati LAB160 söötmele ja inkubeeriti anaeroobses keskkonnas.

Tabel 6. *C. difficile* referentstüvede inhibitsioon kooskultiveerimisel *L. plantarum* Inducia DSM 21379 protsendilise ksülitooli ja 0,75 µl/ml ampitsilliini lisandiga BHI söötmes anaeroobses keskkonnas 0, 24, 48 tundi.

Tüved/kooskultivatsioon		Kasv (log, PMÜ/ml)		
		0 h	24 h	48h
1. <i>L. plantarum</i> Inducia		5,7	8,5	7,3
2. a. <i>C. difficile</i> VPI		5,0	7,7	7,2
2.b. <i>C. difficile</i> M referentstüvi		5,0	7,3	7,3
3. <i>L. plantarum</i> Inducia	<i>C. difficile</i> VPI	6,0	8,3	7,0
	referentstüvi M	5,5	8,5	8,0
4. <i>C. difficile</i> VPI	<i>L. plantarum</i>	5,0	0	0
5. referentstüvi M	Inducia	5,0	5,0	2,0

L. plantarum Inducia DSM 21379 (3) *C. difficile* referentstüvede (4, 5) ko-
kultiveerimisel ksülitooli ja ampitilliini lisandiga BHI söötmes (hamstri mudeli
jäljendamine) oli *C. difficile* vegetatiivsete rakkude kasv inhibeeritud. VPI tüve puhul
oli täielik kasv täielikult inhibeeritud ja M tüve puhul osaline kasvu inhibitsioon 5
logaritmi võrra (5,0-2,0 log PMÜ/ml).

Seega, hamstri mudelit jäljendav *in vitro* katse tõestas *C. difficile* täielikku või osalist
inhibeerimist, kui manustada loomadele ainult *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (tabel
5) või selle kombinatsiooni ksülitooliga (tabel 6).

Näide 5. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli kombinatsioon
inhibeerivad *Clostridium difficile* referentstüve VPI eoste germinatsiooni
Katse eesmärgiks oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 võimet takistada
Clostridium difficile eoste germinatsiooni *L. plantarum* Inducia DSM 21379 eelneval
preinkubeerimisel söötmes. Kontrolliti ka ksülitooli ja taurokolaadi mõju *Clostridium*
difficile eoste germinatsioonile. Taurokolaat on peensooles leiduv aine, mis soodustab
Clostridium difficile eoste germinatsiooni.

L. plantarum Inducia DSM 21379 inkubeeriti erinevaid lisandeid sisaldavas BHI puljongis, anaeroobses keskkonnas 24 tundi. Pärast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 inkubeerimist lisati *Clostridium difficile* eosed ning lisati kontsentreeritud BHI söödet vahekorras 1:10.

- 5 Kontrolli ja katsesegusid inkubeeriti anaeroobses keskkonnas 48 tundi. Kontroll ja katsesegud külvati Fastidious Anaerob Agar söötmele (FAA) ja MRS söötmele, katse alguses, 24 tunni möödudes ja 48 tunni möödudes. Arvutati *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *Clostridium difficile* hulgad.

Tabel 7. *Clostridium difficile* hulgad ($\log_{10}$) eri lisanditega söötmetes (*L. plantarum*

10 Inducia DSM 21379, ksüliitool, taurokolaat)

Segu	kontroll ($\log_{10}$ PMÜ/ml)			Experiment, <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 lisati ($\log_{10}$ CFU/ml) Katsesegu, lisatud <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 ($\log_{10}$ PMÜ/ml)		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
BHI	2,95	6,05	7,45	nd	nd	7,18
BHI + ksüliitool	2,94	7,37	7,95	nd	nd	nd
BHI + ksüliitool + Na-taurokolaathüdraat	3,83	7,83	7,96	nd	nd	nd
BHI + ksüliitool + taurodeoksükoolhape	3,38	8,07	7,67	nd	nd	nd

nd- mitte tuvastatav, (alla määramispiiri, $1,00 \log_{10}$ PMÜ/ml).

- L. plantarum* Inducia DSM 21379 preinkubeerimine ksüliitooli või ksüliitooli ja taurokolaadi kombinatsiooniga BHI söötmes inhibeerib *Clostridium difficile* germinatsioonini (tabel 7). Ksüliitooli ja/või taurokolaadi lisamine BHI söötmele ei mõjutanud *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvu. Antud tulemused toetavad loomkatse tulemusi.

Näide 6. Loomkatse

- Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 mõju referentstüve *Clostridium difficile* VPI 10463 eostega nakatud infektsiooniga hamstritel.

Süüria hamstrid (*Mesocricetus auratus*) sobivad hästi *Clostridium difficile* infektsiooni mudeliks. Rikkudes hamstrate käärsoole mikrofloora antibiootikumide manustamisega ja seejärel manustades loomadele *C. difficile* eoseid, kujuneb loomadel *C. difficile*

kõhulahtisus vähem kui 48 tunni jooksul ja annab 100 protsendilise suremuse.

Toetudes meie *in vitro* katsete tulemustele uurisime, kas *L. plantarum* Inducia DSM 21379 manustamine aitab vähendada *C. difficile* 'ga nakatatud hamstrite suremust. Enne ampitsilliini manustamist (30 mg/kg) manustasime hamstritele sondiga 5-l järjestikusel päeval *L. plantarum* Inducia DSM 21379 suspensiooni 10^{10} PMÜ/ml kas 5-protsendilise ksülitooli lisandiga või ilma. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 manustamist jätkasime kogu katse vältel. Hamstrid nakatati 10-30 *C. difficile* VPI 10463 eosega katse 7. päeval. Hamstreid jälgiti järgnevad 5 päeva ja *C. difficile* infektsiooni sümptomite ilmnedes: märg saba – tehti *C. difficile* A/B toksiini test X/pect Remel test). Kontrollgrupina kasutati *C. difficile* VPI tüvega nakatud hamstreid.

Tabel 8. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja/või ksülitooliga eeltoidetud ja *C. difficile* 'ga nakatatud hamstrid (n=15)

Test grupid	<i>C. difficile</i> ga nakatud ellujäänud hamstrite arv					toksiini test tulemus/loomade arv grupis	5-ndal päeval ellujäänute %
	päev 1	päev 2	päev 3	päev 4	päev 5		
<i>C. difficile</i> VPI 10463I (n=15)	15	6	4	2	2	2 negatiivne/15	2/15 13%
<i>C. difficile</i> VPI +Inducia (n=5)	5	2	2	1	0	0 negatiivne/5	0/5 0%
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool (n=9)	9	9	9	5	5	4 negatiivne/9	5/9 56%
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool + Inducia (n=9)	9	7	7	7	7	7 negatiivne/9	7/9 78%

Seega, *C. difficile* eostega nakatatute seas kõrgeim ellujäämise määr oli *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli lahusega ette toidetud loomade grupis (tabel 8). Antud juhul olid kõik ellu jäänud hamstrite (7/9) toksiini testid negatiivsed, st *C. difficile* eoste germinatsioon oli alla surutud. Ainult ksülitooli manustamisel oli toksiinitest negatiivne neljal loomal ellujäänud viiest ja ainult ühel ellujäänud loomadest oli test positiivne. Seega, *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli kombinatsioon surub alla eoste germinatsiooni toksiini tootvateks vegetatiivseteks rakkudeks. A ja B toksiini leidumise korral kontrollisime ka *C. difficile* kasvu olemasolu peale Inducia ja ksülitooliga

mõjutamist (Tabel 9). *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooliga ettetoidetud ellujäänud kuuel hamstril seitsmest ei tuvastatud *C. difficile* vegetatiivseid rakke (ainult ühel juhul leiti *C. difficile* kasv) peen- ja jämesooles. Nii anaeroobide kui indigeensete laktobatsillide hulka asendav *L. plantarum* Inducia DSM 21379 hulk oli peen- ja jämesooles kõrge. See näitab *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli manustamise kasulikkust soole mikrofloora stabiliseermisel ja taastamisel peale ampitsilliini manustamist ja *C. difficile* eostega nakatumisel.

Tabel 9. Anaeroobide, laktobatsillide, *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* hulgad *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooliga ettetoidetud ja ellujäänud hamstrite peensooles ja jämesooles

katsegrupid	Hams- ter ID	tühisool (PMÜ log10/g)			niudesool (PMÜ log10/g)		
		AN	Indu- cia	<i>C.d.</i>	AN	Indu- cia	<i>C.d.</i>
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool + Inducia (n=7)	T2-1	6,48	4,00	0,00	7,48	6,70	0,00
	T2-2	5,20	4,30	0,00	7,04	7,00	0,00
	T2-3	7,48	4,30	0,00	7,30	6,70	0,00
	T2-4	8,70	6,00	5,00	8,11	7,60	7,00
	T2-5	4,48	0,00	0,00	7,30	6,00	0,00
	T2-7	7,18	5,00	0,00	8,11	6,78	0,00
	T2-8	8,34	6,00	0,00	8,43	6,00	0,00
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool(n=5) eetoidetud	Xyl-1	5,30	ND	2,00	8,43	ND	0,00
	Xyl-2	7,11	ND	0,00	8,30	ND	0,00
	Xyl-3	7,60	ND	5,00	8,38	ND	7,60
	24-1	7,35	ND	0	7,0	ND	0
	24-2	7,15	ND	0	7,8	ND	0

AN – anaeroobid *C.d.* – *Clostridium difficile*

Hamstrite ellujäämismäär oli 22 protsenti suurem tänu *L. plantarum* Inducia DSM 21379 manustamisele (tabel 16). Seda tõestas ka toksiini puudumine jämesoole sisus (tabel 9).

L. plantarum Inducia DSM 21379 hulk oli kõrge tühisooles (vahemikus 0-6,0, mediaan 4,0 PMÜ log10/g) ja niudesooles (6,0-7,6, mediaan 6,7). Tõenäoliselt toimis *L.*

plantarum Inducia DSM 21379 happe produtseerimise ja SCFA profiil kaudu.

C. difficile 'ga nakatatud hamstrite morfoloogilised uuringud

Clostridium difficile infektsiooni moduleerimiseks kasutati tüüpilist hamstri mudelit,

5 kuna patogeneesi peamine modulaator on toksiinide poolt põhjustatud organite kahjustus. Meie katses kasutatav *C. difficile* VPI 10643 omab nii A kui B toksiini ning need toksiinid esinesid ka maksas ja peensooles (joonised fig 2 ja fig 3).

C. difficile infektsioonist ellujäänud hamstritel ei leitud lahkamisel ulatuslikke limaskesta kahjustusi, pseudomembraane ega polümorfonukleaarsete rakkude
10 infiltratsiooni (joonis fig 4a).

C. difficile infektsioonist kahjustatud hamstrite surmaeelseteks iseloomulikeks leidudeks oli põletik koos polümorfonukleaaride infiltratsiooniga limaskesta ja pseudomembraanide olemasolu. Raske enterokoliit põhjustas punaliblede ja polümorfonukleaarsete leukotsüütide infiltratsiooni soole limaskesta, maksa ja põrna,
15 põhjustades loomade surma. Elundites esines hüperemia (joonis fig 5f).

PATENDINÕUDLUS

1. Probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsioon kasutamiseks *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni takistamise ja *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemise allasurumise teel.
5
2. Kompositsioon vastavalt punktile 1, mis sisaldab lisaks ksülitooli.
3. Kompositsioon vastavalt punktile 1 või 2, mis on valitud rühmast, mis sisaldab farmaatsia-, toidu- või veterinaarset kompositsiooni.
- 10 4. Toiduaine, mis sisaldab kompositsiooni vastavalt punktile 1 või 2.
5. Toiduaine vastavalt punktile 4, milleks on piimatoode.
6. Toiduaine vastavalt punktile 5, milleks on fermenteeritud piimatoode.
7. Toiduaine vastavalt punktile 5, milleks on juust.
8. Toiduaine vastavalt punktile 5, milleks on jogurt.
- 15 9. Toidulisand, mis sisaldab kompositsiooni vastavalt punktile 1 või 2.
10. Farmaatsia- või veterinaariatoode, mis sisaldab kompositsiooni vastavalt punktile 1 või 2.
11. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamiseks antimikroobse agendina eksogeenset ja/või endogeenset päritolu *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni takistamise ja *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemise allasurumise teel.
20
12. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamiseks antimikroobse agendina, vastavalt punktile 11 koos ksülitooliga.

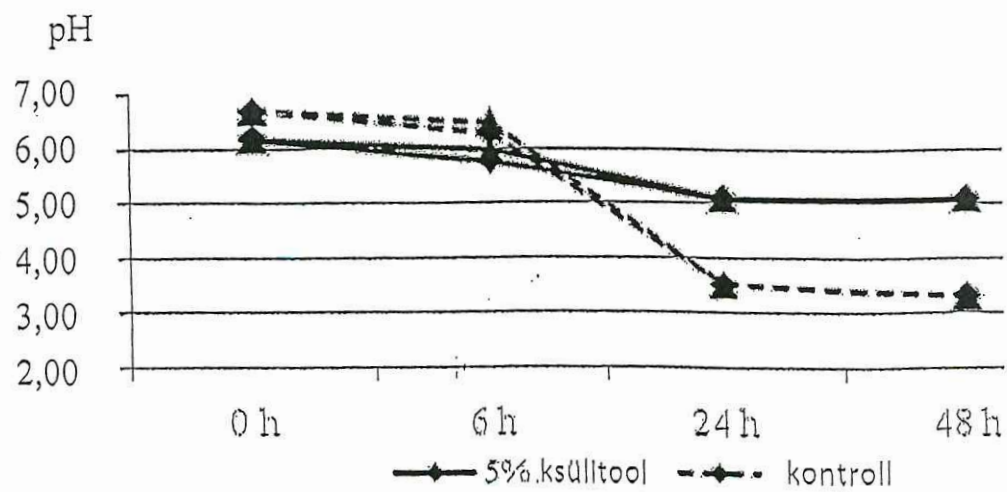


Fig. 1

2/5

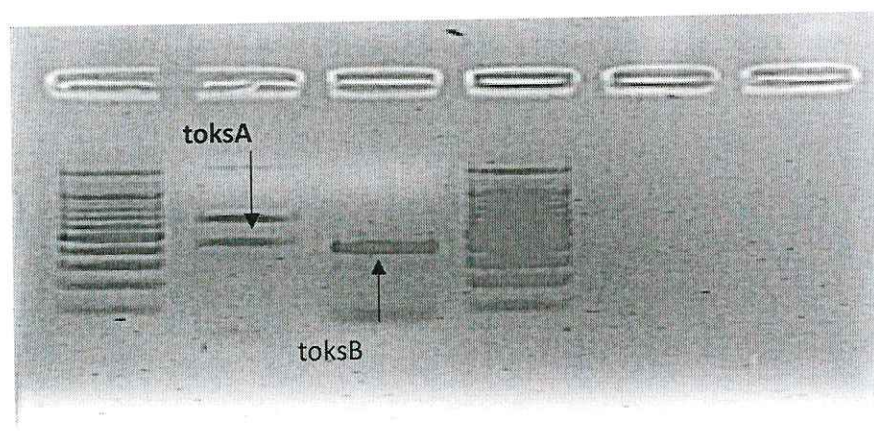


Fig. 2

3/5

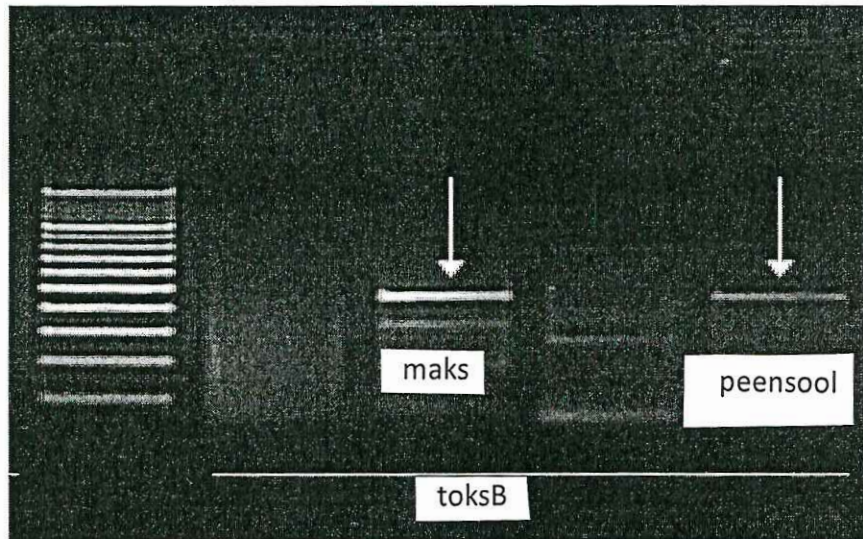


Fig. 3

4/5

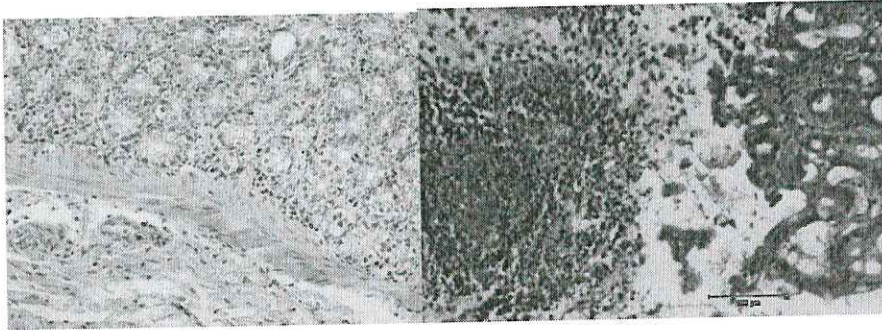


Fig 4a

Fig 4b

5/5

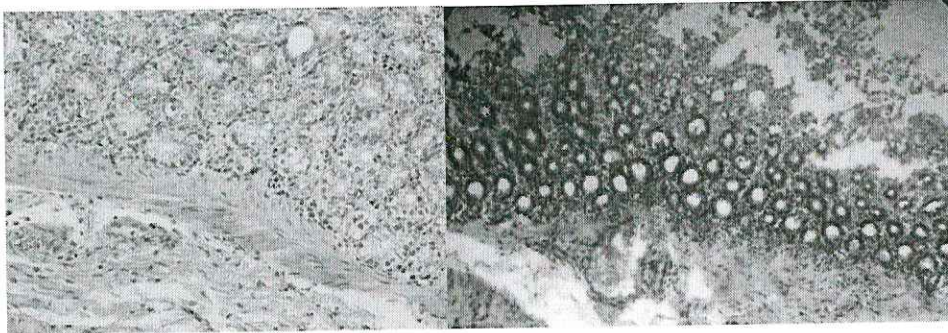


Fig 5a

Fig 5b

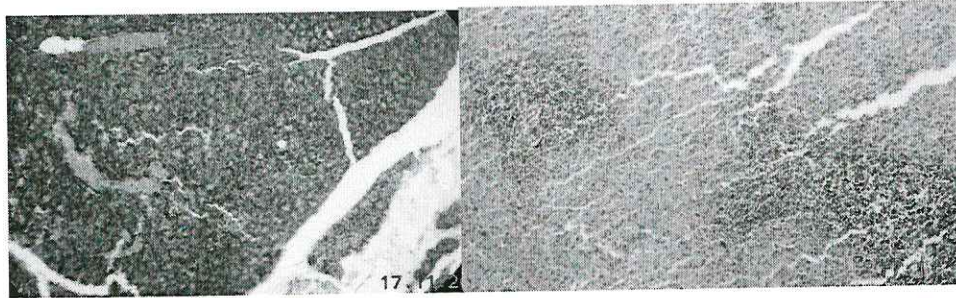


Fig 5c

Fig 5d

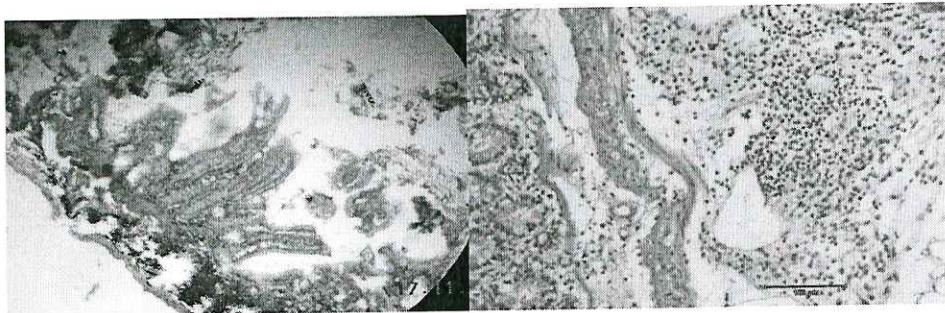


Fig 5e

Fig 5f