

**UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI**

Kinga Kowalska-Duplaga

**OCENA DZIAŁANIA PREPARATU LACTOBIF[®]
(*BIFIDOBACTERIUM RUMINANTII*) W OSTREJ
BIEGUNCE ROTAWIRUSOWEJ ORAZ WPŁYW NA
ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNĄ PRZECIWKO
ROTAWIRUSOM**

Praca doktorska

Bibl. Medyczna CM UJ



Promotor: Prof.dr hab. n. med. Janina Stopyrowa

Kraków 2002

Pragnę wyrazić gorące podziękowania Pani Profesor Janinie Stopyrowej za życzliwość i wsparcie podczas prowadzenia badań oraz cenne uwagi przy przygotowaniu dysertacji.

Panu dr hab. Krzysztofowi Fyderkowi, Kierownikowi Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia, oraz Koleżankom i Kolegom dziękuję za zainteresowanie i okazaną pomoc.

Podziękowania

Serdecznie dziękuję,

Panu Profesorowi Piotrowi Heczko, Kierownikowi Katedry Mikrobiologii CMUJ, za cenne wskazówki, pomoc i życzliwość okazaną mi przy realizacji niniejszej pracy.

Pani Dr Magdalenie Strus i Pani Mgr Grażynie Kukli z Katedry Mikrobiologii CMUJ za pomoc w izolacji szczepów Bifidobacterium.

Panu Profesorowi Juliuszowi Pryjmie, Kierownikowi Zakładu Mikrobiologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego, za umożliwienie wykonywania badań w Pracowni Wirusologicznej i Bakteriologicznej USD oraz Pani mgr Dorocie Kurowskiej-Baran za współpracę przy oznaczeniach immunoenzymatycznych.

Panu Dr Györgiemu Szücsowi i Panu Dr Krisztianowi Banyai z ANTSZ Baranya Megyei Intezete, Regionalis Virus Laboratorium w Pecs na Węgrzech, za pomoc w zakresie badań immunologicznych.

Realizacja badań klinicznych przedstawionych w niniejszej pracy była możliwa dzięki finansowemu wsparciu Komitetu Badań Naukowych w ramach grantu nr 0596/P05/98/15

SPIS TREŚCI

	strona
1. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	7
2. WSTĘP	8
2.1. Charakterystyka rotawirusów	9
2.2. Epidemiologia zakażeń wywołanych przez rotawirusy i aspekty zdrowia publicznego	10
2.3. Objawy kliniczne zakażenia rotawirusowego u dzieci	11
2.4. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie rotawirusowe	12
2.5. Leczenie i zapobieganie biegunkom rotawirusowym	13
2.6. Definicja probiotyków	14
2.7. Rola probiotyków w kształtowaniu składu flory przewodu pokarmowego	17
2.8. Oddziaływanie probiotyków na układ immunologiczny	18
2.9. Wyniki badań nad rolą probiotyków w biegunce rotawirusowej	20
2.10. Charakterystyka preparatu Lactobif [®]	21
3. UZASADNIENIE I CELE PRACY	23
4. MATERIAŁ I METODY	24
4.1. Badana populacja dzieci	24
4.2. Obliczenie wielkości próby	26
4.3. Metoda badania	26
4.4. Opis interwencji oraz charakterystyka aktywnego preparatu i placebo	27
4.5. Plan badania	28
4.6. Ocena kliniczna ciężkości zakażenia	30
4.7. Przygotowanie materiału do wykonywania badań serologicznych i mikrobiologicznych	31
4.8. Badanie mikrobiologiczne stolca	32
4.9. Przygotowanie antygeny HRV do badań serologicznych metodą ELISA	34
4.10. Oznaczanie swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicy	35
4.11. Oznaczanie swoistych przeciwciał klasy IgA w surowicy	36
4.12. Surowica kontrolna i wyznaczenie krzywej wzorcowej	37
4.13. Analiza statystyczna	38

5. WYNIKI	39
5.1. Charakterystyka badanych grup	39
5.2. Ocena nasilenia biegunki rotawirusowej na podstawie objawów klinicznych	41
5.3. Uzyskany materiał do badań	46
5.4. Wyniki posiewu bakteriologicznego stolca	47
5.5. Stężenie swoistych immunoglobulin (IgA i IgG) przeciwwrotawirusowych w surowicy	48
6. DYSKUSJA	50
7. WNIOSKI	57
8. STRESZCZENIE	58
9. SPIS RYCIN	61
10. SPIS TABEL	62
11. PIŚMIENNICTWO	63

1. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

BSA – antygen surowicy bydłej (ang. *bovine serum antygen*)

CBC – bufor zawierający węglan i wodorowęglan sodu (ang. *sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer*)

DPN – doustny płyn nawadniający

ELISA – metoda immunoenzymatyczna (ang. *enzyme-linked immunoabsorbent assay*)

ESPGHAN – Europejskie Towarzystwo Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci

FBS – płodowa surowica bydła (ang. *fetal bovine serum*)

S-IgA – immunoglobulina wydzielnicza klasy IgA

HRV – rotavirus człowieka grupy A (ang. *human rotavirus*)

IgA – immunoglobulina surowicza klasy A

IgG – immunoglobulina surowicza klasy G

LAB – bakterie kwasu mlekowego (ang. *Lactic Acid Bacteria*)

NSP – białko niestrukturalne (ang. *non structural protein*)

OD – gęstość optyczna (ang. *optical density*)

PBS – bufor fosforanowy (ang. *phosphate buffered saline*)

PTGHŻD – Polskie Towarzystwo Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci

VP – białko strukturalne (ang. *viral protein*)

2. WSTĘP

Ostra biegunka jest jedną z najczęstszych przyczyn zachorowań wśród niemowląt i małych dzieci na świecie [11]. Czynnikiem etiologicznym choroby u dzieci z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym są najczęściej zakażenia wirusowe i bakteryjne, a dużo rzadziej grzybicze i pasożytnicze. W krajach o niskim statusie socjoekonomicznym i ciepłym klimacie przyczyną ostrej biegunki z równą częstością są zakażenia bakteryjne i wirusowe [66,83,86,96]. Natomiast w krajach uprzemysłowionych, 50 – 70% biegunek o ustalonej etiologii jest następstwem zakażeń wirusowych [19,83,86,154]. Przyczyną ostrej biegunki u dzieci mogą być rotawirusy, kaliciwirusy (do których należą wirusy Norwalk), astrowirusy, picornawirusy i adenowirusy – zwłaszcza serotypy 40 i 41 [19,26,38,83,86,109,121].

W państwach rozwijających się ostra biegunka jest przyczyną 6,5 miliona zgonów rocznie wśród dzieci do 5. roku życia [103]. W krajach uprzemysłowionych, wyższy poziom i lepsza dostępność opieki medycznej sprawiają, że zgony spowodowane ostrą biegunką należą wprawdzie do rzadkości, ale często jest ona przyczyną hospitalizacji małych dzieci [40,54,56,72,78,87,174]. Wyniki wielu badań epidemiologicznych potwierdziły, że na całym świecie rotawirusy grupy A są głównym czynnikiem etiologicznym ostrych biegunek o ciężkim przebiegu (wymagających leczenia szpitalnego) u niemowląt i dzieci do 2. roku życia [40,42,72,78,79,87,113,136,137,174].

Podstawowym sposobem leczenia ostrej biegunki jest nawadnianie pozajelitowe i/lub podawanie doustnych płynów nawadniających (DPN) [4,127]. Postępowanie takie umożliwia utrzymanie równowagi wodnej i elektrolitowej organizmu oraz zmniejsza częstość występowania ostrych powikłań, ale tylko nieznacznie wpływa na liczbę i charakter stolców, czy czas trwania ostrej biegunki [25]. Często niepokoi to lekarzy, a zwłaszcza rodziców i jest interpretowane jako niepowodzenie leczenia. Pożądanym uzupełnieniem dotychczasowego sposobu leczenia ostrej biegunki byłoby wprowadzenie leków, które skracają czas jej trwania lub zmniejszają nasilenie epizodu.

Od wielu lat podkreśla się ważną rolę jaką w zapobieganiu i zwalczaniu zakażeń przewodu pokarmowego odgrywa bariera jelitowa tworzona przez błonę śluzową, a zwłaszcza jej mikrośrodowisko – w tym prawidłowo ukształtowaną florę bakteryjną [57]. Wchodzące w jej skład bakterie kwasu mlekowego (LAB – *Lactic Acid Bacteria*) wzbudzają zainteresowanie badaczy z zakresu medycyny i biologii, a także przemysłu farmaceutycznego i spożywczego [2,34,101,171]. Szeroko promowana i polecana jest tzw. „zdrowa żywność”, czyli m.in. jogurty i produkty jogurtopodobne, kefiry, mleka acydofilne, czy ostatnio mieszanki mleczne do żywienia niemowląt zawierające probiotyki. Probiotyki, zwłaszcza te dostępne w postaci preparatów farmakopealnych w aptekach, polecane są do zapobiegania i leczenia różnych chorób, także chorób przewodu pokarmowego.

Duża częstość zakażeń rotawirusowych oraz występowanie zachorowań o gwałtownym i ciężkim przebiegu prowadzących do hospitalizacji lub – rzadziej - zgonu dziecka, stanowi silny bodziec stymulujący badania nad opracowaniem skutecznej profilaktyki czynnej lub biernej oraz efektywnych metod wspomagających dotychczasowy sposób leczenia ostrej biegunki o tej etiologii. Jednym z celów prowadzonych na szeroką skalę badań dotyczących różnych szczepów LAB jest ocena ich właściwości probiotycznych, a także wpływu na przebieg ostrej biegunki, w tym spowodowanej przez rotawirusy.

2.1. Charakterystyka rotawirusów

W 1973 roku Ruth Bishop w próbce stolca badanej w mikroskopie elektronowym zidentyfikowała cząsteczki wirusa o średnicy 70 nm, który z uwagi na charakterystyczną morfologię (w barwionych negatywowo preparatach w mikroskopie elektronowym cząstki wirusa przypominają koło ze szprychami) otrzymał nazwę rotawirusa [84].

Rotawirusy należą do rodziny *Reoviridae*. Kompletna cząsteczka ma średnicą 65–75 nm, kształt regularnego dwudziestościanu i nie posiada osłonki lipidowej [47]. Białkowy kapsyd wirusa złożony jest z trzech warstw otaczających genom zbudowany z 11 segmentów dwuniciowego RNA

(dsRNA). Położony wewnątrz wirionu rdzeń tworzą 3 białka strukturalne (*viral protein* – VP): VP1, VP2 i VP3. Posiadają one aktywność polimerazy RNA i biorą udział w transkrypcji RNA wirusa. Głównym elementem budulcowym warstwy pośredniej (czyli kapsydu wewnętrznego) jest hydrofobowe białko VP6, które jest także jest głównym antygenem warunkującym przynależność rotawirusa do określonej grupy serologicznej [84]. Kapsyd zewnętrzny zbudowany jest z dwóch białek: VP4 i VP7. Glikoproteina VP7 pokrywa całą powierzchnię wirionu, podczas gdy białko VP4 tworzy na jego powierzchni „kolcowate” wypustki. Obydwa białka posiadają zdolność wiązania z receptorem na powierzchni komórki i umożliwiają wnikanie wirusa do jej wnętrza [47,48,84].

Oprócz białek strukturalnych wchodzących w skład wirionu, w zakażonej komórce powstają także białka niestrukturalne (*non structural protein* – NSP), których nie stwierdza się w dojrzałej cząsteczce wirusa. Dotychczas opisano pięć takich białek: NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 i NSP5, co do których uważa się, że spełniają ważną rolę w cyklu replikacyjnym wirusów [48]. Najlepiej poznane jest działanie NSP4, która umożliwia przedostawanie się nowopowstałej, dwuwarstwowej cząsteczki wirusa do retikulum endoplazmatycznego. Ekspresja NSP4 powoduje także wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie zakażonych komórek, co wpływa na dojrzewanie cząsteczek rotawirusa oraz przyczynia się do rozpadu komórki z uwalnianiem wirionów do otoczenia. Wykazano, że u zwierząt NSP4 ma działanie enterotoksyny i nasila mechanizm sekrecyjny biegunki [170].

2.2. Epidemiologia zakażeń wywołanych przez rotawirusy i aspekty zdrowia publicznego

Biegunka spowodowana przez rotawirusy grupy A jest jedną z najczęstszych przyczyn hospitalizacji, zwłaszcza u niemowląt do 24. miesiąca życia, z powodu ostrych zespołów biegunkowych [11,40,50,54,79]. W zależności od badanej populacji i stosowanych metod, HRV wykrywano u 25-74% dzieci hospitalizowanych z powodu ostrej biegunki [58,89,97,113].

Wyniki badania wielośrodkowego potwierdziły, że także w Polsce biegunki rotawirusowe są poważnym problemem u dzieci do 5. roku życia, stanowiąc 43% wskazań do hospitalizacji z powodu ostrych zespołów biegunkowych [113]. W krajach uprzemysłowionych o klimacie umiarkowanym stwierdza się charakterystyczną sezonowość zachorowań spowodowanych zakażeniem rotawirusowym, ze szczytem przypadającym na chłodne miesiące roku [11,40,54,79,113]. Przebieg ostrej biegunki rotawirusowej u niektórych dzieci jest bardzo burzliwy. Dotyczy to zwłaszcza najmłodszych dzieci, poniżej 2. roku życia, które są także obciążone największym ryzykiem wystąpienia powikłań w przebiegu choroby. Szczyt zachorowań na biegunkę rotawirusową przypada pomiędzy 6. i 24. miesiącem życia [172].

Leczenie szpitalne dzieci chorych na ostrą biegunkę stanowi olbrzymi problem ekonomiczny. Przeprowadzone w latach 1994–1996 badanie wielośrodkowe wykazało, że w Polsce średni czas hospitalizacji dziecka z biegunką rotawirusową wynosił 9,8 dni, a koszt leczenia jednego epizodu oszacowano na 1258 PLN [113]. W niektórych krajach aż 75% wydatków na leczenie biegunki rotawirusowej stanowił koszt pobytu w szpitalu [11]. Wynika z tego, że wprowadzenie leków skracających czas trwania ostrej biegunki rotawirusowej, a tym samym czas hospitalizacji z jej powodu, mogłoby przynieść wymierne korzyści ekonomiczne w postaci obniżenia kosztów leczenia szpitalnego.

Skuteczne leczenie wspomagające epizodu biegunkowego mogłoby także ograniczyć liczbę wizyt kontrolnych w gabinetach lekarskich, a skrócenie czasu trwania choroby umożliwiłoby rodzicom lub opiekunom wcześniejszy powrót do pracy.

2.3. Objawy kliniczne zakażenia rotawirusowego u dzieci

Zakażenie rotawirusem może mieć różne nasilenie: od postaci subklinicznej, poprzez łagodną biegunkę do stanów przebiegających z ciężkim odwodnieniem, nierzadko stanowiącym zagrożenie życia. U większości chorych stwierdza się podwyższoną temperaturę ciała, często powyżej 39°C

[135], a także wymioty, które zwykle poprzedzają wystąpienie biegunki [50,135]. Badania laboratoryjne mogą ujawnić obecność kwasicy metabolicznej oraz zaburzenia elektrolitowe (hipernatriemię, hipokaliemię). Objawy ostrej infekcji rotawirusowej ustępują zazwyczaj w ciągu 4–10 dni [181].

U dziecka z prawidłową czynnością układu odpornościowego w przebiegu zakażenia nie dochodzi do wiremii [84], a proces infekcji ogranicza się do błony śluzowej jelita. U chorych z niedoborami odporności lub będących w trakcie leczenia immunosupresyjnego zakażenie rotawirusem może mieć przewlekły charakter, przebiegać z wiriemią lub pod postacią ciężkiego zakażenia prowadzącego do zgonu [53,116,177].

2.4. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie rotawirusowe

Większość dzieci (ok.90%) nabywa przeciwciała przeciwko rotawirusowi do końca 3. roku życia [3,115,179], a ich miano, najczęściej na skutek reinfekcji, pozostaje przez dłuższy czas wysokie [3,119].

Badania przeprowadzone na zwierzętach i u ludzi, wykazały że w następstwie naturalnego zakażenia rotawirusem w surowicy pojawiają się najpierw swoiste przeciwciała klasy IgM, a następnie IgA i IgG, zaś w świetle jelita dominują swoiste przeciwciała wydzielnicze klasy IgA (S-IgA) [35,60,71,155]. Nasilenie odpowiedzi immunologicznej w postaci wzrostu miana swoistych przeciwciał klasy IgA jest znamienne większe po przebyciu zakażenia objawowego niż bezobjawowego, podczas gdy przeciwciała należące do klasy IgG nie wykazują takiej zależności [118]. Miano swoistych przeciwciał klasy IgA i IgG w surowicy wykazuje dodatnią korelację z odpornością na ponowne zakażeniem i(lub) zachorowanie [14,118], chociaż w większości przypadków dopiero druga infekcja, w tym także bezobjawowa, pozwala uzyskać ochronny poziom przeciwciał przeciwko ciężkim i umiarkowanym epizodom biegunki [172]. Zdaniem innych badaczy, swoiste przeciwciała nie chronią przed ponownym zakażeniem, a jedynie zapobiegają zachorowaniom o ciężkim przebiegu [17].

Zakażenie rotawirusem dotyczy przede wszystkim jelita cienkiego, stąd odpowiedź na zakażenie jest związana z obecnością przeciwciał na powierzchni błony śluzowej. Wzrost miana swoistych przeciwciał wydzielniczych S-IgA w świetle jelita jest czułym wskaźnikiem przebycia zakażenia pierwotnego lub reinfekcji, nawet o przebiegu subklinicznym [32,33,105]. Ponadto utrzymywanie się podwyższonego miana S-IgA (S-IgA-plateau) zabezpiecza przed ponownym zakażeniem i wystąpieniem objawów choroby [32,105,107]. Podobne działanie wykazują nabyte biernie swoiste przeciwciała wydzielnicze, np. u niemowląt karmionych piersią [124]. Miano przeciwciał wydzielniczych w stolcu dobrze koreluje z obecnością swoistych przeciwciał wydzielniczych w świetle jelita cienkiego [60]. Stwierdzono również dodatnią korelację pomiędzy mianem swoistych IgA w surowicy i poziomem tych przeciwciał w stolcu [13].

2.5. Leczenie i zapobieganie biegunkom rotawirusowym

Leczenie biegunki wywołanej przez rotawirusy polega przede wszystkim na uzupełnieniu płynów i elektrolitów drogą doustną za pomocą DPN oraz wczesnej realimentacji [144]. Zgodnie z zaleceniami Grupy Roboczej ds. Ostrej Biegunki ESPGHAN oraz Sekcji ds. Ostrej Biegunki PTGHŻD niezwłocznie po skutecznym uzupełnieniu niedoborów wody (faza rehydratacji) wskazany jest powrót do sposobu żywienia sprzed epizodu choroby [166,175]. Niekiedy nasilenie biegunki, a zwłaszcza duża intensywność wymiotów, uniemożliwiają skuteczne nawodnienie drogą doustną. Zachodzi wówczas konieczność nawadniania pozajelitowego, co stanowi główną przyczynę leczenia szpitalnego chorych dzieci. Uzupełnienie niedoboru wody i elektrolitów skutecznie zapobiega ciężkim powikłaniom biegunki, jednak nie zmniejsza nasilenia choroby (w tym liczby biegunkowych stolców i częstotliwości wypróżnień) i nie skraca czasu jej trwania.

Jak dotąd nie dysponujemy możliwością stosowania przyczynowego leczenia ostrej biegunki rotawirusowej. Wynikiem wieloletnich badań z zakresu swoistej profilaktyki czynnej było opracowanie szczepionki (RRV-

TV), stanowiącej skuteczną ochronę przed zachorowaniem na biegunkę rotawirusową o ciężkim przebiegu [55,85,131,160,173]. Wprowadzona w USA do sprzedaży, została jednak po kilku miesiącach wycofana z uwagi na zwiększenie ryzyka wystąpienia wglóbenia jelitowo-jelitowego po pierwszej dawce szczepionki [114]. Podejmowane są także próby stosowania gotowych, swoistych przeciwciał (hiperimmunizowanej siary bydłowej [120,146], żółtka jaja kurzego [145,178] czy ludzkiej gammaglobuliny [12,63]), zarówno w leczeniu, jak i profilaktyce ostrej biegunki rotawirusowej, jednak wyniki tych interwencji są niejednoznaczne. Stwierdzono także, że wyłączenie karmienia piersią niemowląt zmniejsza ryzyko, choć nie zapobiega całkowicie zachorowaniom na biegunkę rotawirusową o ciężkim przebiegu u dzieci <2. roku życia [27]. Działanie to może być spowodowane biernym nabywaniem od matki swoistych przeciwciał lub też wpływem karmienia piersią na rozwój korzystnej flory bakteryjnej (LAB) w przewodzie pokarmowym niemowlęcia.

2.6. Definicja probiotyków

Historia probiotyków sięga zamierzchłych czasów, czyli okresu gdy ludzie zaczęli spożywać produkty pochodzące z fermentacji mleka. Korzystny wpływ tego rodzaju pokarmu na zdrowie człowieka zaobserwowano zanim jeszcze zidentyfikowano szczepy bakterii odpowiedzialne za ten stan. Ponad 100 lat temu Ilia Miecznikow jako pierwszy powiązał długowieczność i dobry stan zdrowia górali kaukaskich z faktem systematycznego spożywania przez nich produktów mlecznych poddanych fermentacji, a wyniki swoich obserwacji opublikował w czasopiśmie naukowym [108].

Słowo „probiotyk” pochodzi od greckiego „*πρός βίος*” i oznacza „dla życia”. Klasyczna definicja podana w 1989 roku przez Fullera określa mianem probiotyków żywe drobnoustroje, dodawane lub wchodzące w skład pożywienia, które wywierają dobroczynny wpływ na stan zdrowia gospodarza poprzez modyfikowanie równowagi mikrobiologicznej w jego przewodzie pokarmowym [51,52,142]. Ostatnio Scherezenmeir i De Vrese zaproponowali modyfikację tej definicji, tak by mianem probiotyków określić preparaty lub

produkty, które zawierają określoną, odpowiednio dużą ilość żywych drobnoustrojów i korzystnie (poprzez zaszczepienie lub kolonizację) wpływają na mikroflorę gospodarza [150].

Drobnoustroje probiotyczne stosowane u ludzi powinny spełniać następujące wymagania [138]:

1. pochodzić mikroflory organizmu zdrowego człowieka;
2. posiadać ściśle określoną przynależność rodzajową i gatunkową, zdefiniowaną w oparciu o metody biologii molekularnej;
3. wykazywać odporność na działanie soku żołądkowego i soli żółciowych;
4. posiadać określone właściwości powierzchniowe i adherencyjne określone na podstawie badań *in vitro* w hodowli tkankowej;
5. wykazywać aktywność antagonistyczną wobec typowych patogenów przewodu pokarmowego;
6. potwierdzać swoje działanie probiotyczne w prawidłowo przeprowadzonych badaniach klinicznych (randomizacja, metoda podwójnie ślepej próby z placebo).

Do drobnoustrojów probiotycznych, które mogą wykazywać właściwości lecznicze należą bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus* oraz drożdżaki z rodzaju *Saccharomyces*. Jednak, jak dotąd, dobrze scharakteryzowano zaledwie kilkanaście szczepów probiotycznych. Szczepy probiotyków, których skuteczność w leczeniu lub profilaktyce ostrej biegunki potwierdzono w badaniach klinicznych z randomizacją, zestawiono w tabeli 1.

Wszystkie szczepy probiotyczne stosowane do leczenia powinny być całkowicie bezpieczne. Powszechnie uważa się, że szczepy *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*, wchodzące w skład prawidłowej mikroflory przewodu pokarmowego zdrowego człowieka, nie stanowią zagrożenia, o czym może świadczyć również ich wieloletnie stosowanie [159]. W badaniach dużej populacji ludzi w Finlandii nie stwierdzono działań niepożądanych związanych ze stosowaniem *Lactobacillus* GG [148]. Istnieją pojedyncze doniesienia

kazuistyczne opisujące zapalenie wsierdzia czy posocznicę wywołaną przez nieprobiotyczny szczep *Lactobacillus* [6,8].

Tabela 1. Szczepy probiotyczne, których skuteczność w leczeniu lub profilaktyce ostrej biegunki potwierdzono w badaniach z randomizacją

Nazwa szczepu	Działanie udowodnione w badaniach klinicznych
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	skraca czas trwania i łagodzi biegunkę HRV [75,76,81,153], zapobiega szpitalnym zakażeniom HRV [165], zwiększa wytwarzanie swoistych przeciwciał kl. IgA przeciw HRV [81]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LB	skraca czas trwania ostrej biegunki [157]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	skraca czas i łagodzi przebieg ostrej biegunki, zwłaszcza o etiologii HRV [151,152]
<i>Streptococcus thermophilus</i> i <i>Bifidobacterium bifidum</i>	zapobieganie szpitalnym biegunkom rotawirusowym [140]
<i>Saccharomyces boulardii</i>	nawroty zapalenia jelita wywołanego przez <i>C. difficile</i> [106], skraca czas trwania ostrej biegunki [23]

2.7. Rola probiotyków w kształtowaniu składu flory przewodu pokarmowego

Przewód pokarmowy noworodka jest jałowy. Niemal bezpośrednio po porodzie następuje jego kolonizacja, pierwotnie przez florę bakteryjną pochodzącą z pochwy i przewodu pokarmowego matki, a następnie przez bakterie pochodzące ze środowiska zewnętrznego [61]. Przewód pokarmowy ulega szybszej kolonizacji u dziecka urodzonego siłami natury niż przez cięcie cesarskie [61,90]. Mikroflora przewodu pokarmowego małych dzieci różni się od stwierdzanej u osób dorosłych [65]. Wykazano również różnice w składzie mikroflory przewodu pokarmowego niemowląt karmionych pokarmem matki i dzieci żywionych mieszankami przemysłowymi. Podczas gdy u pierwszych dominują drobnoustroje należące do rodzaju *Bifidobacterium* lub - rzadziej - *Lactobacillus*, u drugich częściej stwierdza się *Enterobacteriaceae* lub *Bacteroides* [70,180]. Stopniowo, wraz ze zmianą diety [158], dochodzi do ustabilizowania się populacji drobnoustrojów, które na stałe zamieszkują przewód pokarmowy zdrowego człowieka. W przeważającej liczbie są to bakterie beztlenowe, należące do rodzajów: *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, oraz ziarenkowce Gram-dodatnie (*Peptococcus* i *Peptostreptococcus*), a także *Clostridium*, *Enterococcus* i *Fusobacterium* [159]. Prawidłowa flora jelitowa wraz ze zdrową błoną śluzową jelita tworzą barierę ochronną zabezpieczającą przewód pokarmowy przed osiedlaniem się i nadmierną proliferacją chorobotwórczych drobnoustrojów, działaniem szkodliwych czynników chemicznych oraz antygenów pokarmowych.

Raz ukształtowaną florę przewodu pokarmowego stosunkowo trudno jest zmienić lub zmodyfikować. Większość bakterii spożywanych w codziennej diecie jest wydalana ze stolcem. Skład stałej flory jelitowej może ulegać przejściowym zmianom - niekorzystnym pod wpływem stosowania antybiotyków lub na skutek zakażeń, stresu, zmiany diety lub klimatu, bądź też korzystnym po spożyciu pożądaných gatunków bakterii [9,92]. Nie ulega wątpliwości, że prawidłowa mikroflora przewodu pokarmowego odgrywa

istotną rolę w ochronie przewodu pokarmowego przed działaniem drobnoustrojów chorobotwórczych [147,159,169].

Mechanizm korzystnego działania probiotyków w profilaktyce i leczeniu ostrej biegunki nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Bakterie probiotyczne posiadają zdolność wytwarzania wielu aktywnych substancji (kwasy organiczne, bakteriocyny, lantybiotyki, nadtlenuk wodoru) działających antagonistycznie w stosunku do bakterii chorobotwórczych [77,88,156]. Probiotyki mogą także współzawodniczyć z wirusami i bakteriami chorobotwórczymi o miejsca wiążące na komórkach nabłonka jelitowego i w ten sposób zapobiegać zakażeniom [28,29,44,45]. Nie bez znaczenia jest także współzawodnictwo o składniki odżywcze potrzebne do wzrostu drobnoustrojów chorobotwórczych oraz stymulacja układu immunologicznego.

Wiele z przeprowadzonych badań miało na celu ocenę skuteczności określonych probiotyków w leczeniu biegunek, zwłaszcza biegunki spowodowanej zakażeniem rotawirusem oraz profilaktyce biegunki związanej ze stosowaniem antybiotyków i biegunki podróźnych [2]. W tym ostatnim przypadku wyniki badań nie są jednoznaczne i wydaje się, że duże znaczenie oprócz wyboru właściwego szczepu probiotycznego ma również miejsce podróży i endemiczny w danym regionie czynnik etiologiczny zakażeń jelitowych [117,126].

We wspomagającym leczeniu ostrej biegunki rotawirusowej oprócz *L. rhamnosus* GG [62,125] skuteczne okazały się także takie probiotyki, jak *Lactobacillus acidophilus* LB [157] i *Lactobacillus reuteri* [151,152]. U dzieci, *L. rhamnosus* GG nie zmieniał przebiegu biegunki o potwierdzonej etiologii bakteryjnej w porównaniu z placebo [62, 153].

2.8. Oddziaływanie probiotyków na układ immunologiczny

W przewodzie pokarmowym, a zwłaszcza w jelicie cienkim człowieka mieści się duża część układu immunologicznego – tkanka limfatyczna błon śluzowych jelita (GALT – *gut-associated lymphoid tissue*). Podstawowym zadaniem limfocytów układu pokarmowego jest modyfikacja odpowiedzi

immunologicznej na antygeny dostające się do światła jelit oraz wytwarzanie IgA, które wydzielane są do przewodu pokarmowego, gdzie działają obronnie przeciwko drobnoustrojom [91]. Wydaje się, że niektóre probiotyki mogą nieswoiście stymulować układ immunologiczny i w efekcie powodować nasilenie odpowiedzi immunologicznej przeciwko różnym antygenom. Podawanie *Lactobacillus* GG dzieciom chorym na chorobę Crohna zwiększało wytwarzanie IgA przeciwko białkom mleka krowiego [100]. U myszy podawanie *Bifidobacterium longum* stymuluje wytwarzanie swoistych wydzielniczych przeciwciał klasy IgA przeciwko β -laktoglobulinie, dzięki czemu ogranicza penetrację niestrawionych antygenów pokarmowych przez błonę śluzową do krwi [168]. W odniesieniu do *Lactobacillus rhamnosus* GG wykazano, że wpływa on na zmniejszenie stężenia TNF w kale u niemowląt chorych na atopowe zapalenie skóry z alergią na białka mleka krowiego [98], stymuluje zwiększone wytwarzanie IL-10 u dzieci z różnymi postaciami alergii [123], oraz dzięki właściwościom immunomodulującym skutecznie zapobiega chorobom atopowym u dzieci z grup zwiększonego ryzyka [82]. U dorosłych ochotników podawanie fermentowanych produktów mlecznych zawierających *Lactobacillus acidophilus* La1 i *Bifidobacterium* Bb12 nasilało swoistą odpowiedź humoralną (zwiększenie miana swoistych IgA w surowicy) na zakażenie *S. typhi* [95]. Podawanie w diecie *Bifidobacterium lactis* HNO19 stymulowało immunologiczną odpowiedź komórkową [24]. W badaniach *in vitro* dotyczących 10 różnych szczepów LAB stwierdzono, że niektóre spośród nich (*L. rhamnosus* E509 i E522 oraz *B. animalis* E508) zwiększają produkcję TNF- α i IL-6, a tym samym stymulują nieswoistą odpowiedź immunologiczną [110].

W innych badaniach oceniających wpływ *Lactobacillus casei* Shirota [161], *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum* [41] na odpowiedź immunologiczną u zdrowych ochotników nie wykazano żadnego lub tylko nieznaczne działanie stymulujące.

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań nie są jednoznaczne i mogą sugerować, że nie każdy ze szczepów uznawanych za probiotyczne ma wpływ na układ immunologiczny. Znacznie lepiej poznany jest wpływ

niektórych probiotyków na odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom (patrz 2.8).

2.9. Wyniki badań nad rolą probiotyków w biegunce rotawirusowej

Liczne badania z użyciem probiotyków dotyczą ich działania w biegunce wywołanej rotawirusem. Szczepem o najlepiej, jak dotąd, udokumentowanej skuteczności klinicznej w ostrej biegunce rotawirusowej u niemowląt i dzieci jest *Lactobacillus rhamnosus* szczep GG (ATCC 53013). Udowodniono, że podawanie tego probiotyku skraca czas trwania biegunki [75,76,81,95,153,168] nawet o 24,8 godzin [95% CI, -31,8 do -17,9] [167] u dzieci hospitalizowanych z powodu biegunki rotawirusowej oraz u leczonych doustnymi płynami nawadniającymi w domu [64]. Europejskie badanie wieloośrodkowe przeprowadzone pod patronatem ESPGHAN także potwierdziło korzystny wpływ *Lactobacillus rhamnosus* GG na przebieg biegunki rotawirusowej [62]. Działanie to obejmuje nie tylko skrócenie czasu trwania biegunki, ale także zmniejsza ryzyko przedłużania się epizodu i wpływa na wcześniejsze zakończenie leczenia szpitalnego. Podawanie tego probiotyku nasila także odpowiedź immunologiczną na zakażenie rotawirusowe [99].

Stwierdzono, że podawanie *Lactobacillus rhamnosus* GG znamienne zwiększa nasilenie nieswoistej odpowiedzi humoralnej w ostrej fazie choroby, poprzez zwiększenie liczby komórek wydzielających immunoglobuliny, oraz wpływa na utrzymywanie się przez dłuższy czas dużej liczby komórek wydzielających swoiste przeciwciała klasy IgA [81].

W badaniach z użyciem placebo wykazano, że stężenie swoistych przeciwciał IgA przeciwko rotawirusom zwiększało się znamienne u dzieci leczonych probiotykami w porównaniu do chorych z grupy kontrolnej [81,168,95]. Ponadto wykazano, że u dzieci szczepionych przeciwko rotawirusom, które równocześnie otrzymywały *Lactobacillus* GG, miano swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusom było znamienne większe niż w grupie kontrolnej [74]. Działanie probiotyczne w biegunce rotawirusowej wykazuje także *Lactobacillus reuteri* [151,152].

Niektóre szczepy probiotyczne znalazły również zastosowanie w profilaktyce biegunki rotawirusowej w grupie ryzyka, jaką są niemowlęta przyjmowane do szpitala. Wykazano, że podawanie takim dzieciom *L.rhamnosus* GG [165] lub *B. bifidum* i *S. thermophilus* zmniejszało ryzyko szpitalnej biegunki rotawirusowej [140].

W prawidłowo zaplanowanych badaniach klinicznych, jak dotąd, oceniono skuteczność zaledwie kilku preparatów probiotycznych w leczeniu ostrej biegunki u dzieci [21,23,62,75,81,151,152,153,157]. Niestety, niemal żaden z badanych szczepów, a przede wszystkim *L. rhamnosus* GG, którego skuteczność potwierdzono w sposób powtarzalny, nie jest dostępny w Polsce (wyjątkiem jest *S. boulardii*, który oceniono jednak tylko w jednym badaniu obejmującym dzieci [23]). Probiotyki stanowią atrakcyjną metodę leczenia ostrej biegunki, bo są bezpieczne i – w porównaniu z innymi preparatami (np. doustnymi immunoglobulinami) – stosunkowo niedrogie.

2.10 Charakterystyka preparatu Lactobif®

Lactobif® (produkowany w Wytwórni Surowic i Szczepionek Biomed w Krakowie) jest zarejestrowanym w Polsce preparatem bakteryjnym, dopuszczonym na podstawie zezwolenia Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej nr 794/S/5.11.73 r. do stosowania w leczeniu różnych zespołów biegunkowych u niemowląt i dzieci. Preparat odpowiada Normie Jakościowej Producenta nr ZN-BK/MZiOS/1/98.

Szczep bakterii znajdujących się w preparacie Lactobif® wyizolowano ponad 30 lat temu z przewodu pokarmowego zdrowego noworodka i włączono do kolekcji PZH w 1972 r pod numerem 352. Dostępnymi wówczas metodami, na podstawie cech morfologicznych, szczep zidentyfikowano jako *Bifidobacterium bifidum*. Identyfikację przeprowadzono także w 1972 r w Instytucie Mikrobiologii AM w Krakowie, stwierdzając że cechy morfologiczne i właściwości biochemiczne badanego gatunku bakterii odpowiadają opisom *Bifidobacterium bifidum* podanym w: „Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (VII ed, Williams and Wilkins, Baltimore,

1957: 545-546) i „Identification Methods for Microbiologists” (Part A, Gibbs BM, Skinner FA; ed Academic Press, London and New York 1966: 72). Producent gwarantuje, że od momentu wprowadzenia szczepu do produkcji, jego rodowód nie uległ zmianie [43]. Niemniej, przeprowadzona w drugiej połowie 2001 roku przez dr hab. Jacka Bardowskiego z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, analiza mikrobiologiczna i genetyczna szczepu używanego do wytwarzania preparatu Lactobif[®], wykazała, że ustalona metodą PCR sekwencja DNA (o długości 1254 par zasad) odpowiada szczepowi *Bifidobacterium ruminantium* [7].

W świetle ostatnich badań należy uznać, że 1 ampulka preparatu Lactobif[®] zawiera liofilizowaną zawiesinę pałeczek *Bifidobacterium ruminantium*. Liczba żywych komórek zdolnych do tworzenia kolonii (CFU-*colony forming unit*) mieści się w granicach 10^9 - 10^8 komórek w 1 ampulce. Preparat występuje w postaci liofilizowanej substancji bezpostaciowej lub krystaliczno-igielkowej. Sucha masa posiada kolor biały lub kremowy i jest łatwo rozpuszczalna w wodzie. Zgodnie z zaleceniami producenta preparat przechowuje się w temperaturze +2 do +8 °C, a przed podaniem rozpuszcza w chłodnej przegotowanej wodzie [43].

3. UZASADNIENIE I CELE PRACY

Liczne badania kliniczne dotyczące probiotyków koncentrują się na pewnej niewielkiej grupie szczepów LAB i *Saccharomyces bulardii* oraz dotyczą wybranych chorób [75,140,152,157,176]. Podkreśla się, że uzyskiwane wyniki badań są swoiste zarówno dla określonego szczepu jak i badanej choroby.

Dotychczas w leczeniu ostrej biegunki najlepiej udokumentowano skuteczność *Lactobacillus rhamnosus* GG, zwłaszcza w zakażeniach wywołanych rotawirusem [64,95,153]. Szczep ten jednak nie jest dostępny w Polsce, gdzie 70% lekarzy często sięga po inne probiotyki [164]. Niestety, w stosunku do większości z nich (wyjątek stanowi Enterol zawierający *Saccharomyces bulardii*) nie przeprowadzono jak dotąd prawidłowo zaplanowanych badań klinicznych, których wyniki stanowiłyby wiarygodną podstawę do stosowania tych preparatów. Istnieje więc konieczność dokonania takiej oceny, gdyż stosowanie preparatów nieskutecznych zwiększa jedynie koszt terapii.

Lactobif[®] został wybrany jako jeden z probiotyków od dawna dostępny w polskich aptekach, a więc potencjalnie zalecany przez lekarzy i stosowany przez pacjentów.

Celem badania była:

1. ocena skuteczności preparatu Lactobif[®] w leczeniu ostrej biegunki rotawirusowej u dzieci do 24. miesiąca życia, a szczególnie wpływu na czas jej trwania (pierwotny punkt końcowy);
2. ocena wpływu preparatu Lactobif[®] na nasilenie ostrej biegunki rotawirusowej u badanych dzieci;
3. ocena wpływu preparatu Lactobif[®] na stężenie swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusom w klasie IgG i IgA w surowicy u badanych dzieci w fazie rekonwalescencji po biegunce rotawirusowej.

4. MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia¹ Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (CMUJ) w Krakowie w okresie od stycznia 1999 r. do czerwca 2001 r. Przed rozpoczęciem badania protokół kliniczny uzyskał akceptację Stałej Komisji Etycznej ds. Badań Klinicznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego² (opinia nr KE/98/08/B/204 z dn. 02.10.1998).

4.1. Badana populacja dzieci

Badaniem objęto dzieci hospitalizowane w Oddziale Niemowlęcym Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia CMUJ, w wieku od 4. tygodnia do 24. miesiąca, u których rozpoznano ostrą biegunkę wywołaną zakażeniem HRV. Podstawą wstępnego rozpoznania biegunki rotawirusowej był dodatni wynik badania stolca na obecność antygenów HRV, który wykonywano na oddziale za pomocą testu lateksowego Slidex Rota-Kit 2 (bioMérieux, Lyon, Francja). Rozpoznanie weryfikowano następnie metodą immunoenzymatyczną (ELISA) za pomocą gotowych zestawów do oznaczania antygeny HRV: IDEATM Rotavirus (DACO Diagnostic Ltd., Ely, Cambridgeshire, UK) [128]. U wszystkich badanych dzieci wykluczono zakażenie pałeczkami: *Salmonella* i *Shigella* na podstawie wyniku posiewu stolca na podłożach selektywnych [podłoża stałe do hodowli *Shigella* i *Salmonella*; Wytwórnia Surowic i Szczepionek w Warszawie]. Do badania zakwalifikowano tylko te dzieci, których rodzice lub opiekunowie, po uzyskaniu wyczerpujących informacji o celu i sposobie prowadzenia badania klinicznego, wyrazili pisemną zgodę na udział ich dzieci w projekcie badawczym.

Podczas trwania badania, z diety dziecka wykluczano produkty pochodzące ze sfermentowanego mleka (jogurt, kefir, itp.), jak również nie podawano innych preparatów o właściwościach probiotycznych.

¹ do lutego 1999 pod nazwą II Klinika Chorób Dzieci Collegium Medicum UJ

¹ od. 2000 roku: Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kryteria włączenia dzieci do badania:

- wiek od 4. tygodnia do ukończenia 2. roku życia;
- ostra biegunka definiowana jako wystąpienie przynajmniej 3 stolców biegunkowych w ciągu 24 godzin poprzedzających zakwalifikowanie do badania;
- potwierdzona etiologia rotawirusowa – na podstawie wykrycia antygenu HRV w stolcu (ELISA);
- biegunka trwająca nie dłużej niż 48. godzin przed rozpoczęciem interwencji
(tzn. przed podaniem pierwszej dawki preparatu).

Kryteria wykluczające dziecko z udziału w badaniu obejmowały:

- wiek powyżej 24 miesięcy;
- inna niż rotawirusowa etiologia biegunki;
- dzieci, u których oprócz antygenu HRV w stolcu stwierdzono również patogenne bakterie jelitowe (*Salmonella*, *Shigella*, *E.coli* patogenne i in.);
- udowodnione zespoły zaburzeń wchłaniania (w tym celiakia) oraz przewlekłe nieswoiste zapalenie jelit;
- leczenie antybiotykiem;
- karmienie wyłącznie piersią;
- potwierdzone niedobory odporności i leczenie immunosupresyjne;
- podawanie glikokortykosteroidów dłużej niż 5 dni w dawce >2 mg/kg mc (w przeliczeniu na prednizon);
- brak zgody rodziców lub opiekunów na udział dziecka w badaniu.

4.2. Obliczenie wielkości próby

Za pierwotny punkt końcowy badania przyjęto czas trwania biegunki. Uznano, że minimalny, istotny dla lekarza i chorego czas skrócenia biegunki wynosi 24 godziny. Taką różnicę wykazano w prawidłowo przeprowadzonych badaniach oceniających skuteczność probiotyków w leczeniu ostrej biegunki [75,81]. Do obliczenia wielkości próby zastosowano test T dla zmiennych niepowiązanych (porównanie średnich) korzystając z programu komputerowego StatsDirect (wersja 1.9.14, Camcode, UK). Przy randomizacji 1:1 i założeniu, że różnica między badanymi grupami wynosi 24 godziny (odchylenie standardowe [SD]: 30 h), przyjmując możliwość popełnienia błędu $\beta = 20\%$ (moc 80%) i $\alpha = 5\%$ obliczono, że do każdej z grup należy zakwalifikować przynajmniej 26 dzieci. Po uwzględnieniu, że około 15% z nich może nie ukończyć badania zaplanowano, że minimalna liczebność każdej z grup powinna wynosić po 30 chorych.

4.3. Metoda badania

Badanie przeprowadzono z randomizacją, metodą podwójnie ślepej próby z użyciem placebo. Listę randomizacyjną utworzyła osoba niezależna, niezwiązana z badaniem przy pomocy standardowej funkcji pakietu statystycznego Statistica Pl. V.5.0. Obie kopie listy zostały umieszczone w zalepionych kopertach. Jedną otrzymała Wytwórnia Surowic i Szczepionek Biomed w Krakowie, natomiast druga lista pozostała zabezpieczona do momentu zakończenia badania i wykonania wszystkich oznaczeń.

Dzieci zakwalifikowane do badania otrzymywały preparat zgodnie z kolejnością numeracji, co po rozkodowaniu badania pozwoliło dokonać podziału na 2 grupy: I – eksperymentalną (otrzymującą Lactobif[®]); II – kontrolną (otrzymującą placebo).

Za główny punkt końcowy badania uznano ocenę czasu trwania biegunki. Jako hipotezę badawczą przyjęto założenie, że podawanie preparatu Lactobif[®] dzieciom w wieku od 4. tygodnia do 24. miesiąca życia chorym na

ostrą biegunkę o etiologii rotawirusowej skraca czas jej trwania przynajmniej o 24 godziny.

Do wtórnych punktów końcowych zaliczono:

- biegunkę trwającą >72 godzin od rozpoczęcia interwencji;
- wymioty utrzymujące się >24 godzin od rozpoczęcia interwencji;
- biegunkę trwającą >7 dni od czasu pojawienia się pierwszych objawów;
- nasilenie biegunki;
- zmianę stężenia swoistych przeciwciał klasie IgG i IgA przeciwko HRV w surowicy w okresie rekonwalescencji (3-4 tygodni po zakwalifikowaniu do badania) w stosunku do stężenia w ostrej fazie choroby;
- wystąpienie działań niepożądanych.

4.4. Opis interwencji oraz charakterystyka aktywnego preparatu i placebo

Dzieci losowo zakwalifikowano do jednej z 2 grup, w których oprócz standardowego leczenia biegunki podawano doustnie 2 razy dziennie przez 5 dni: (1) Lactobif[®] lub (2) placebo. Preparat przed podaniem rozpuszczano w 3 ml wody.

Placebo stanowił nośnik mleczny stosowany do zawieszenia pałeczek *Bifidobacterium ruminantium*. Wygląd makroskopowy badanego preparatu i placebo był identyczny. Ampułki zawierające Lactobif[®] i placebo zostały przygotowane przez producenta (Wytwórnia Surowic i Szczepionek Biomed w Krakowie). Dla każdego dziecka przygotowano w oddzielnym opakowaniu komplet ampulek na całą kurację, który dodatkowo zawierał 5 zapasowych ampulek. Ampułki oznaczono nazwą badania i kodem liczbowym z listy randomizacyjnej. Opakowanie zewnętrzne (biały kartonik) opatrzone nalepką z adnotacją: etykieta zastępcza oraz numerem badania i kodem liczbowym (ryc.1). Puste ampułki zwracano osobie prowadzącej badanie, co umożliwiło dodatkową kontrolę dawkowania preparatu u zakwalifikowanych chorych.



Ryc.1. Zdjęcie przedstawiające preparat „Lactobif” (*Bifidobacterium ruminantium* lub placebo) przygotowany do potrzeb badania

4.5. Plan badania

Niezwłocznie po przyjęciu chorego dziecka na oddział oceniano stopień odwodnienia (wg skali klinicznej WHO [132]) i jego masę ciała. Po okresie rehydratacji (stosowanie DPN lub nawadnianie dożylne) rozpoczynano fazę realimentacji w oparciu o dietę stosowaną przed epizodem biegunki (wg zaleceń ESPGAN [144,175]), kontynuując za pomocą nawadniania dożylnego lub doustnego uzupełnianie bieżącej utraty wody i elektrolitów z biegunkowymi stolcami.

Przed podaniem pierwszej dawki preparatu Lactobif[®] lub placebo pobierano 1,5 ml krwi (próbka I.) w celu oznaczenia miana swoistych przeciwciał anti-HRV klasy IgG i IgA w surowicy. Ponadto pobierano I. próbkę stolca w celu hodowli *Bifidobacterium ruminantium* (potwierdzenie obecności żywych drobnoustrojów probiotycznych w jelicie).

Kolejne próbki stolca do hodowli pobierano w następujących przedziałach czasowych:

- 24-32 godzin po podaniu 1. dawki preparatu (próbka II.);

- w 3. dobie stosowania preparatu (próbka III.);
- 5.dni po rozpoczęciu stosowania preparatu - zakończenie pełnej kuracji (próbka IV.);
- 3–6 tygodni po zakończeniu podawania preparatu - wizyta kontrolna (próbka V.; tab. 2.)

Wyniki hodowli próbek II – IV miały stanowić dowód na zdolności przetrwania badanego szczepu bakterii w przewodzie pokarmowym. Natomiast wynik hodowli z próbki V. przemawiał by za zdolnością (lub jej brakiem) badanego szczepu *Bifidobacterium* do długotrwałej kolonizacji przewodu pokarmowego.

Po 3–6 tygodniach od zakończenia podawania preparatu dzieci zgłaszały się do kontroli w ambulatorium. Rodziców proszono, by dzień wcześniej pobrali próbki stolca do otrzymanego zestawu transportowego. W trakcie wizyty kontrolowano masę ciała oraz ogólny stan zdrowia dziecka, a także pobierano 1,5 ml krwi (próbka 2.) w celu oznaczenia miana swoistych przeciwciał anti-HRV klasy IgG i IgA. Próbka stolca służyła do hodowli *Bifidobacterium ruminantium* (próbka V).

Oznaczenie miana swoistych przeciwciał na początku zakażenia oraz po 3 – 6 tygodniach pozwoliło określić nasilenie odpowiedzi immunologicznej.

Tabela 2. Plan badania

dzień	przed 1. dawką	1	2	3	4	5	21-42
stolec HRV	x						
IgA anty-HRV	x						x
IgG anty-HRV	x						x
Lactobif [®] lub placebo		x	x	x	x	x	
stolec – hodowla	x		x	x		x	x
masa ciała	x	x	x	x	x	x	x
temperatura ciała	x	x	x	x	x	x	
l. epizodów wymiotów/dbobę	x	x	x	x	x	x	
l. stolców /dobę	x	x	x	x	x	x	

4.6. Ocena kliniczna ciężkości zakażenia

Nasilenie objawów chorobowych spowodowanych zakażeniem rotawirusem oceniano za pomocą 20-punktowej skali klinicznej zaproponowanej przez A.Z. Kapikiana [59,135]. Skala ta umożliwia ocenę nasilenia epizodu biegunkowego i z niewielkimi modyfikacjami jest stosowana przez wielu badaczy zajmujących się problematyką zakażeń rotawirusowych. Oceniane parametry oraz punktację zależną od nasilenia objawu przedstawia tabela 3. W skali punktowej oceniającej całość epizodu uwzględniano dane z wywiadu, codziennej obserwacji pielęgnarskiej i badania lekarskiego.

Stopień odwodnienia określano na podstawie objawów klinicznych (wg kryteriów WHO [132]) lub w stosunku do masy ciała po ukończeniu nawadniania. Nasilenie epizodu biegunkowego w kolejnych dniach trwania interwencji oceniano na podstawie sumy punktów wynikającej z karty codziennej obserwacji pacjenta (tab. 4). Czas trwania biegunki od momentu rozpoczęcia interwencji określano w godzinach. Za punkt końcowy uznawano ostatni oddany przez chorego stolec biegunkowy (płynny lub półpłynny).

Tabela 3. Punktowa skala do oceny nasilenia biegunki rotawirusowej wg Kapikiana

Parametr		Punktacja
Czas trwania biegunki	< 2 dni	1
	3 dni	2
	≥ 4 dni	3
Maksymalna liczba stolców biegunkowych w ciągu doby	< 3	0
	3	1
	4 – 5	2
	≥ 6	3
Czas utrzymywania się wymiotów	brak wymiotów	0
	1 – 2 dni	2
	≥ 3 dni	3
Maksymalna liczba wymiotów na dobę	brak wymiotów	0
	1	1
	2	2
	≥ 3	3
Stopień odwodnienia	brak cech odwodnienia	0
	< 5% masy ciała	2
	≥ 5% masy ciała	3
Maksymalna temperatura	< 37,6°C	0
	37,6 – 38,4°C	1
	≥ 38,4°C	2
Czy hospitalizacja była konieczna	tak	3
	nie	0

Tabela 4. Karta codziennej obserwacji pacjenta

Maksymalna temperatura ciała: < 37,6°C 37,6 – 38,4°C > 38,4°C	Punkty: 0 1 2	Ilość epizodów wymiotów/dobę: brak 1 2 3	Punkty: 0 1 2 3
Stopień odwodnienia brak objawów < 5% > 5%	Punkty: 0 1 2	Ilość stolców biegunkowych/dobę: <3 3 4-5 ≥6	Punkty: 0 1 2 3

4.7. Przygotowanie materiału do wykonywania badań serologicznych i mikrobiologicznych

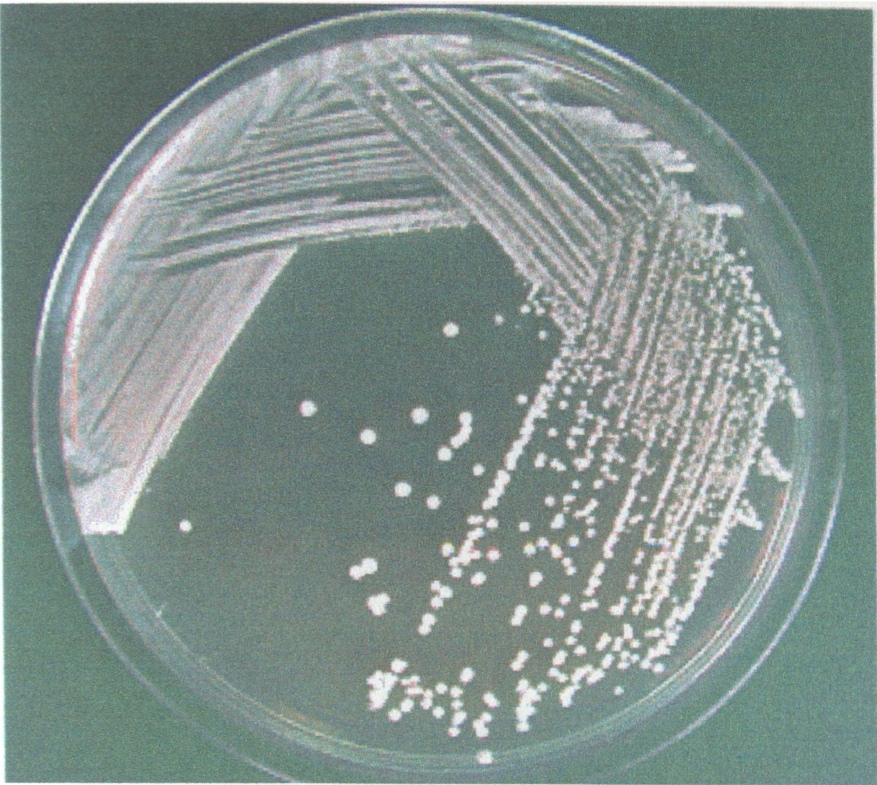
Próbki krwi pobierano do szklanych probówek i pozostawiano do czasu utworzenia się skrzepu (30 min). Następnie próbkę odwirowywano przy 1000 g przez 15 min. Uzyskaną surowicę porcjowano do plastikowych probówek i zamrażano w temp. -20°C do czasu wykonywania oznaczeń. Przygotowanie materiału do badań serologicznych wykonano w laboratorium Zakładu Mikrobiologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego CMUJ oraz w Katedrze Immunologii Klinicznej i Patologii CMUJ.

Próbki stolca do hodowli bakterii pobrane w godzinach 7^{00} - 15^{00} (godziny pracy Pracowni Bakteriologicznej Zakładu Mikrobiologii USD) umieszczano w jałowych plastikowych pojemnikach, które niezwłocznie przesyłano do Pracowni Bakteriologicznej. W pozostałych godzinach oraz w dni świąteczne stolce pobierano na podłoże transportowe dla bakterii beztlenowych [Biologiczny Zestaw Transportowy nr 1 (Biomed, Kraków, Polska)] i w ciągu 24 godzin dostarczano do Pracowni Bakteriologicznej. Tak samo były pobierane próbki stolca w warunkach pozaszpitalnych: u dzieci, które zostały wypisane do domu przed ukończeniem 5- dniowej kuracji oraz próbka V. przed badaniem kontrolnym. Materiał wysiewano po wieloboku na stałe podłoże wzrostowe MRS agar (de Man, Rogosa, Sharp, Oxoid) i pozostawiano do inkubacji w temp. 37°C w warunkach beztlenowych z

wykorzystaniem anaerostatów (bioMerieux) z generatorami mieszaniny gazu zawierającej H_2+CO_2 (Linegal Chemicals GmbH). Po 24–72 godzinach z zachowaniem warunków beztlenowych inkubowane płytki przewożono do Katedry Mikrobiologii CMUJ, w której dokonywano identyfikacji szczepów *Bifidobacterium*.

4.8. Badanie mikrobiologiczne stolca

Badanie mikrobiologiczne próbek stolca wraz z identyfikacją szczepów *Bifidobacterium* prowadzono w Katedrze Mikrobiologii CMUJ. Z wyhodowanych na podłożu wzrostowym kolonii wybierano kolonie podobne do wzorca i przesiewano w sektorach (podłoże wzrostowe MRS o składzie: wyciąg mięsny, wyciąg z drożdży, glukoza, Tween 80 i składniki buforujące) [133]. Hodowle inkubowano przez 24–72 godziny w temp. 37°C. Na podłożu agarowym MRS badany szczep tworzył kremowo-białe, śluzowate kolonie (ryc.2). Następnie, po wybarwieniu metodą Grama identyfikowano szczepy *Bifidobacterium* na podstawie cech morfologicznych w porównaniu do hodowli wzorcowej przy użyciu mikroskopu optycznego (powiększenie 100x) (ryc.3). W części przypadków wykonano dalszą, szczegółową identyfikację badanego szczepu przy użyciu testu API 50 CHL (bioMérieux, Francja).



Ryc.2 Hodowla *Bifidobacterium ruminantium* na podłożu wzrostowym MRS. Szczep tworzy kremowo-białe kolonie



Ryc.3 Preparat *Bifidobacterium ruminantium* po wybarwieniu metodą Grama (obraz z mikroskopu optycznego; powiększenie 100x)

4.9. Przygotowanie antygeny HRV do badań serologicznych metodą ELISA

Do badania użyto wiriony laboratoryjnego szczepu rotawirusa małego SA 11, który przygotował dr Krisztian Banyai (ANTSZ, Baranya Megyei Intezete, Regionalis Virus Laboratorium; Pecs, Węgry). Szczep SA 11 posiada identyczny z HRV grupowoswoisty antygen (VP6), a większość przeciwciał wykrywana metodą ELISA skierowana jest przeciwko temu antygenowi [84].

Potrzebną do wykonania oznaczeń ilość antygeny uzyskano poprzez namnożenie SA 11 w hodowli komórkowej MA 104 (linia komórkowa i szczep laboratoryjny pochodziły z laboratorium M.K. Estes, Houston, TX, USA). Jako płynu wzrostowego dla komórek używano DMEM (GIBCO-BRL) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej (FBS – Fetal Bovine Serum; Sigma). Hodowlę prowadzono w szklanych probówkach inkubowanych przez 3 dni w temperaturze 37 °C. Po uzyskaniu jednolitej warstwy komórek aspirowano roztwór zawierający FBS, a hodowlę komórkową przepłukiwano 3-krotnie DMEM w celu usunięcia resztek surowicy bydlęcej. Po trzecim płukaniu do hodowli komórkowej dodawano 20 ml DMEM i pozostawiano do inkubacji na 40-60 min w temperaturze 37°C. Inokulum zawierające rotawirusy SA 11 aktywowano za pomocą trypsyny (do osiągnięcia stężenia 40 µg/ml) przez 30 minut, po czym dodawano je do probówek z komórkami. Ostateczne stężenie trypsyny w płynie hodowlanym wynosiło 2 µg/ml, co zapewnia zachowanie zakaźności wirusa. Po inokulacji hodowle inkubowano przez 2 do 4 dni, aż do wystąpienia efektu cytopatycznego we wszystkich komórkach. Lizaty komórek zamrażano i rozmrażano 3 razy w temperaturze -70°C. W celu usunięcia zniszczonych fragmentów komórek próbki wirowano z szybkością 4000 rpm przez 5 minut. Uzyskany supernatant badano w kierunku obecności antygeny rotawirusa testem ELISA. Antygen kontrolny stanowił częściowo oczyszczony lizat niezakażonych komórek MA 104 z płynem hodowlanym przygotowany identycznie jak opisano powyżej.

4.10. Oznaczanie swoistych przeciwciał klasy IgG w surowicy

Swoiste przeciwciała w klasie IgG oznaczono metodą pojedynczego rozcieńczenia za pomocą techniki *capture* ELISA. Do badania wykorzystano protokoły stosowane również przez innych badaczy [18,112,118], wprowadzając konieczne modyfikacje opisane szczegółowo poniżej. Metoda jednego rozcieńczenia polega na wykreśleniu krzywej standardowej na podstawie kolejnych rozcieńczeń surowicy wzorcowej o znanym mianie przeciwciał, a następnie odczytywaniu stężenia swoistych przeciwciał w surowicach badanych na podstawie wartości gęstości optycznej (OD) (patrz: 4.12).

Płytki zawierające 96 dołków z płaskim dnem (Sigma) opłaszczano nakładając po 60 μ l roztworu hiperimmunizowanej surowicy króliczej zawierającej swoiste przeciwciała przeciwko rotawirusowi człowieka (DAKO) rozcieńczonej 1:400 w buforze węglanowo-wodorowęglanowo sodowym (CBC buffer; Sigma) o pH 9,5. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 4°C, po czym przepłukiwano cztery razy buforem do płukania (PBS [pH 7,2] zawierający 0,05% Tween 20 [Sigma]). W celu zablokowania pozostałych wolnych miejsc wiążących do każdego dołka dodano 100 μ l roztworu 4% BSA (Sigma) w PBS. Po trwającej 1 godzinę inkubacji w temperaturze 37°C dołki przemyto jednorazowo buforem do płukania (PBS-0,05% Tween 20). Antygen rotawirusa (SA 11) oraz antygen kontrolny rozcieńczano 1:10 w 10% roztworze FBS z 1% BSA w PBS (FBS/BSA/PBS). Do dołczków nakładano odpowiednio po 50 μ l SA 11 i antygeny kontrolnego. Płytki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37°C, a następnie płukano 4 razy i nakładano po 50 μ l surowicy badanej rozcieńczonej 1:100 w FBS/BSA/PBS. Wszystkie badane surowice testowano dwukrotnie, a każdą nakładano równolegle do dołczków opłaszczonych antygenem rotawirusa i antygenem kontrolnym. Do każdej serii oznaczeń dołączano surowicę kontrolną rozcieńczaną seryjnie od 1:100 do 1: 6400. Po trwającej 60 minut inkubacji w temperaturze 37°C płytki przemywano pięć razy buforem do płukania i do każdego dołka dodawano 50 μ l roztworu króliczych przeciwciał przeciw IgG człowieka sprzężonych z peroksydazą w rozcieńczeniu 1:3000 (w

FBS/BSA/PBS). Płytki inkubowano ponownie przez 60 minut w temperaturze 37°C, następnie przemywano sześć razy buforem do płukania i dodano 100 µl roztworu znacznika barwnego: czterometylobenzydyny (Organon Teknika), będącej substratem dla peroksydazy. Po 15 minutach inkubacji, w ciemnym pomieszczeniu, w temperaturze pokojowej dodawano 50 µl 1N H₂SO₄ celem zatrzymania reakcji enzymatycznej. Gęstość optyczną (OD) produktu reakcji barwnej odczytywano przy długości fali 450 nm (wartość referencyjna 620 nm) w aparacie Reader 530 (Organon Teknika). Za wynik dodatni uznawano wartość OD \geq 0,1, która była 2-krotnie większa od odczytu w próbce kontrolnej.

Do każdej płytki z surowicami badanymi dołączano standardowo pięć kolejnych dwukrotnych rozcieńczeń surowicy kontrolnej (od 1:100 do 1:1600). Wszystkie odczynniki przygotowywano w wodzie dejonizowanej. Każdą parę surowic badano na tej samej płytce.

4.11. Oznaczanie swoistych przeciwciał klasy IgA w surowicy

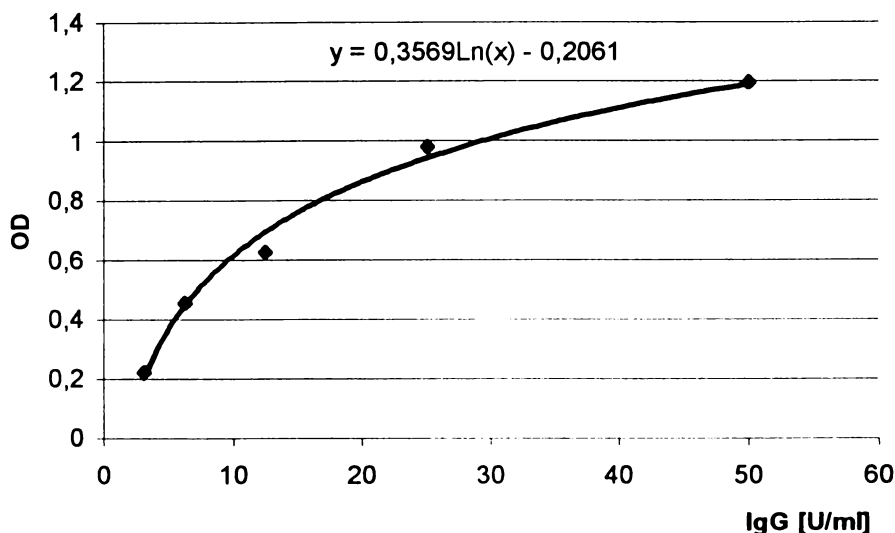
Swoiste przeciwciała w klasie IgA oznaczano podobnie jak IgG metodą *capture* ELISA, przy czym do wykrycia swoistych IgA związanych z fazą stałą użyto przeciwciał króliczych przeciwko surowiczej IgA człowieka sprzężonych z peroksydazą (Sigma). Oznaczenie swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusowi wykonano w ANTSZ, Baranya Megyei Intezete, Regionalis Virus Laboratorium; Pecs, Węgry.

Badanie poziomu swoistych przeciwciał przeciw rotawirusowi ograniczono do sprawdzenia zmiany ich poziomu w surowicy. Miana swoistych przeciwciał w surowicy i soku dwunastniczym wykazują silną dodatnią korelację [13], a trudności metodologiczne i ograniczenia finansowe uniemożliwiły badanie swoistych przeciwciał wydzielniczych S-IgA, będących czułym wskaźnikiem zakażenia HRV.

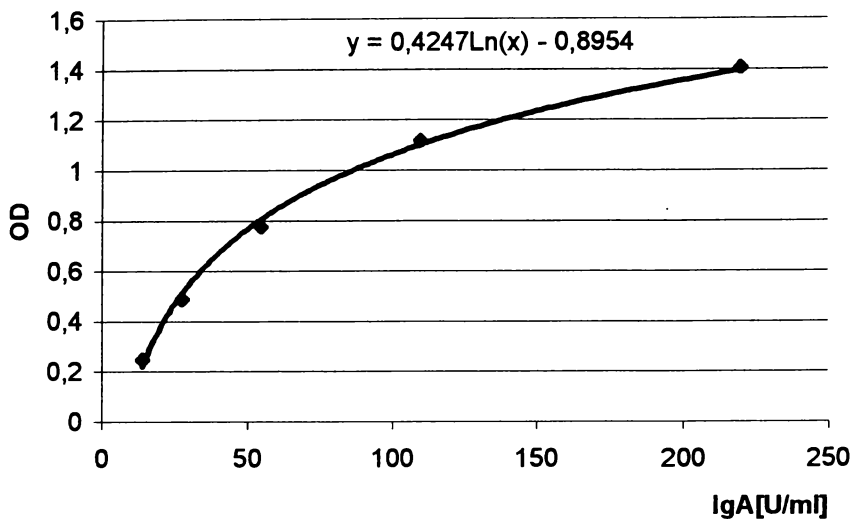
4.12. Surowica kontrolna i wyznaczenie krzywej wzorcowej

Surowicę, wybraną jako surowica kontrolna do sporządzenia krzywej wzorcowej wyselekcjonowano spośród wielu surowic uzyskanych od osób dorosłych. Surowica (R3149/2002) została pobrana od zdrowej, 38-letniej kobiety. Rozcieńczenia surowicy kontrolnej w teście ELISA w punkcie odcięcia ($OD=0,1$) wynosiły: dla IgG – 1:4628, a dla IgA – 1:21946. Arbitralnie przyjęto, że w 1 ml surowica ta zawiera 5000 jednostek (U) przeciwciał klasy IgG i 22 000 U przeciwciał klasy IgA przeciwko rotawirusowi. W seryjnych dwukrotnych rozcieńczeniach surowicy od 1: 100 do 1: 16000 znajduje się odpowiednio: od 50 do 3,125 U IgG/ml i 220 do 13,75 U IgA/ml.

Stężenie swoistych przeciwciał klasy IgA i IgG w badanych surowicach wyznaczano z krzywej wzorcowej (ryc.4a,b) posługując się wartością skorygowaną OD. Obliczano ją jako średnią arytmetyczną różnic z dwóch oznaczeń, między antygenem badanym i kontrolnym. Uzyskaną wartość mnożono przez 100 (rozcieńczenie badanych surowic) [18,31]. Za serokonwersję uznawano co najmniej 28% wzrost poziomu przeciwciał w 2. próbie, pobranej w fazie rekonwalescencji [118,172].



Ryc.4a. Krzywa wzorcowa stężenia swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusowi klasy IgG w surowicy kontrolnej.



Ryc.4b. Krzywa wzorcowa stężenia swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusowi klasy IgA w surowicy kontrolnej.

4.13. Analiza statystyczna

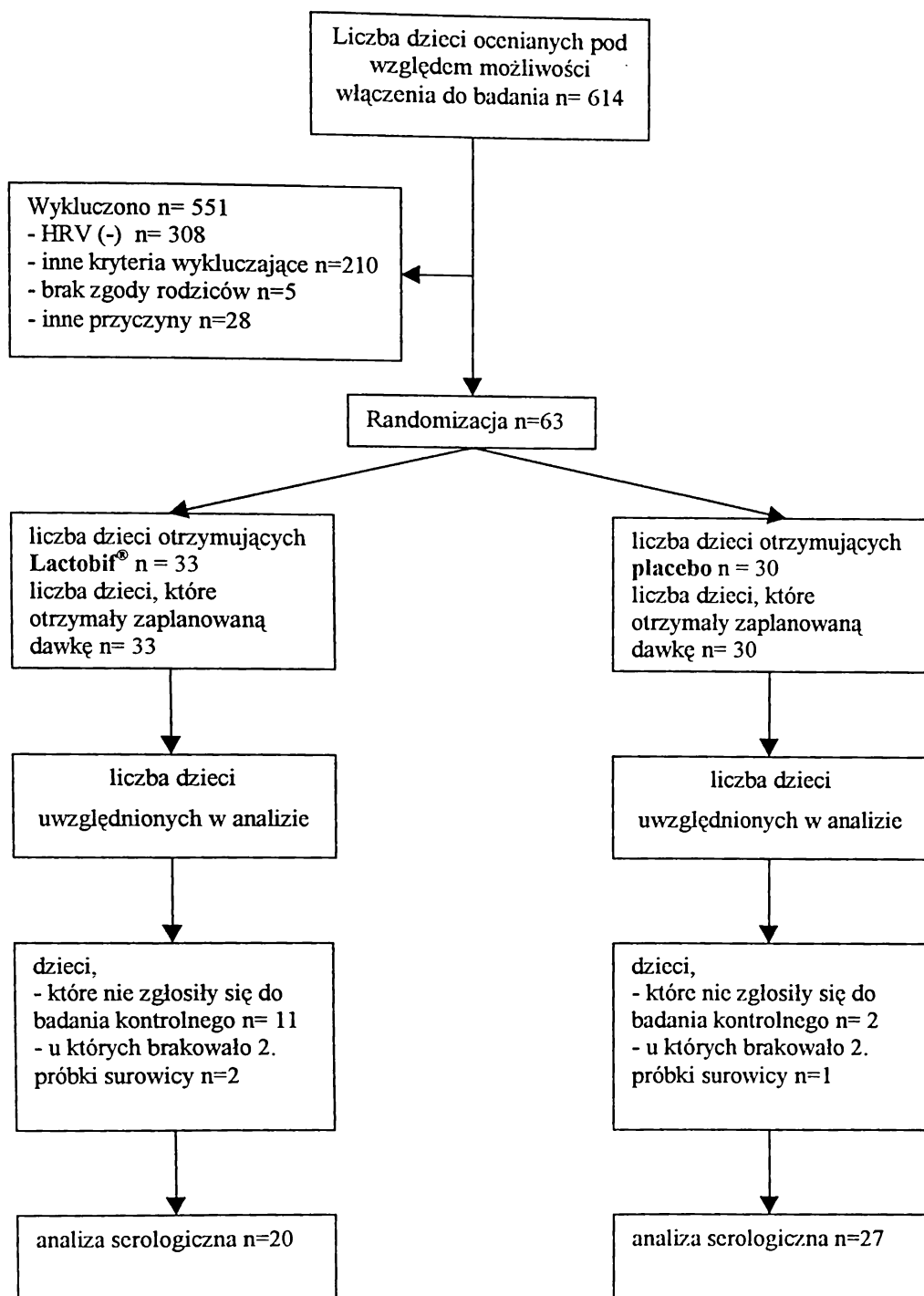
Do analizy różnic pomiędzy wyróżnionymi grupami stosowano w przypadku danych o charakterze ciągłym i rozkładzie normalnym test t-Studenta, a dla wartości dyskretnych - testy nieparametryczne. Do porównania zmian wartości mierzonych parametrów w danej grupie użyto odpowiednich, parametrycznych lub nieparametrycznych testów dla wartości sparowanych. Do porównania częstości występowania zjawisk w obydwu grupach wykorzystano test χ^2 oraz dokładny test Fishera. W obliczeniach zastosowano program komputerowy Statistica (wersja 5.0). Do oceny prawdopodobieństwa ustąpienia biegunki pod wpływem badanej interwencji zastosowano metodę analizy przeżycia Kaplana i Meiera, a przebieg krzywych przeżycia porównano testem logarytmicznym rang. W obliczeniach zastosowano program komputerowy StatsDirect (wersja 1.9.14, Camcode, UK). Za próg istotności statystycznej przyjęto wartość $<0,05$.

5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka badanych grup

W okresie od stycznia 1999 roku do czerwca 2001 roku w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia hospitalizowano 614 dzieci, u których powodem przyjęcia do szpitala była ostra biegunka lub epizod ostrej biegunki wystąpił w trakcie leczenia szpitalnego. Na podstawie testu lateksowego zakażenie rotawirusem stwierdzono u 306 dzieci, spośród których 99 spełniało kryteria kwalifikacji do badania (rys. 3).

Badanie przeprowadzono u 63 dzieci: 29 dziewczynek i 34 chłopców w wieku od 2,5 do 24 miesięcy; średni wiek dzieci wynosił 12,98 (\pm SD 5,03) miesięcy. Na drodze randomizacji dzieci zakwalifikowano do grup otrzymującej badany preparat, Lactobif[®] (33 dzieci: 14 dziewcząt i 19 chłopców; średnia wieku 12,59 \pm 5,21 miesięcy), oraz do grupy placebo (30 dzieci: 15 dziewczynek i 15 chłopców; średnia wieku 13,41 \pm 4,87 miesięcy). Obie grupy nie różniły się pod względem płci ($p=0,36$; test Fishera) i wieku zakwalifikowanych dzieci ($p=0,51$; test t-Studenta). Charakterystykę obydwóch grup przedstawiono w tabeli 5. Wszystkie dzieci ukończyły pierwszą część badania (ocena skuteczności klinicznej). Drugą część badania (analiza wpływu na odpowiedź immunologiczną) ukończyło 50 dzieci; 13 nie zgłosiło się na wizytę kontrolną. U dzieci, które zgłaszały się na wizytę kontrolną pobierano drugą próbkę surowicy krwi do oznaczenia poziomu swoistych przeciwciał klasy IgA i IgG przeciw rotawirusowi. Ponieważ jednak 2 próbki surowic nie nadawały się do wykonania oznaczeń, a jedna zaginęła, w analizie statystycznej dotyczącej wpływu Lactobifu[®] na swoistą odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom uwzględniono 47 dzieci: 20 otrzymujących Lactobif[®] i 27 otrzymujących placebo.



Rys. 5 Diagram przedstawiający kolejne etapy rekrutacji i randomizacji dzieci do badania.

Tabela 5. Charakterystyka badanych grup pacjentów przed rozpoczęciem interwencji.

	Lactobif[®]	placebo	p
liczebność grup	n=33	n=30	
wiek (mies.)^f	12,5 (±5,21) ^f	13,4 (±4,87)	0,72 [‡]
pleć (dziewczynki, chłopcy)	14; 19	15; 15	0,61 [#]
nasilenie biegunki (skala Kapikiana)^f	15,72 (±3,3)	16,6 (±2,4)	0,45 [†]
masa ciała przy przyjęciu (g)^f	9398 (±2054,9) zakres od 5200 do 16280	9314 (±2188,4) zakres od 6130 do 15000	0,72 [‡]
stężenie sodu w surowicy (mmol/l)^f	139,96 (±2,98)	139,6 (±2,44)	0,6 [‡]
stężenie potasu w surowicy (mmol/l)^f	4,29 (±0,48)	4,32 (±0,56)	0,83 [‡]
stopień odwodnienia			0,86 [*]
brak	1	1	
<5%	24	20	
>5%	8	9	
pH^f	7,38 (±0,5)	7,37 (±0,5)	0,29 [‡]
niedobór zasad w surowicy (mmol/l)^f	- 7,6 (±2,8)	- 7,7 (±2,4)	0,85 [‡]

[#] dokładny test Fishera;

[†] test Manna-Whitney'a

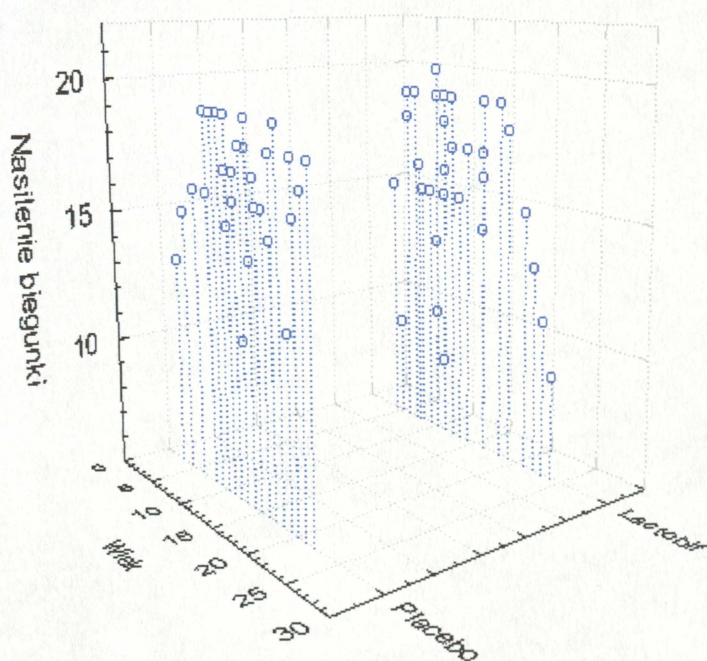
[‡] test t-Studenta

^{*}test χ^2

^fśrednia arytmetyczna ± odchylenie standardowe

5.2. Ocena nasilenia biegunki rotawirusowej na podstawie objawów klinicznych

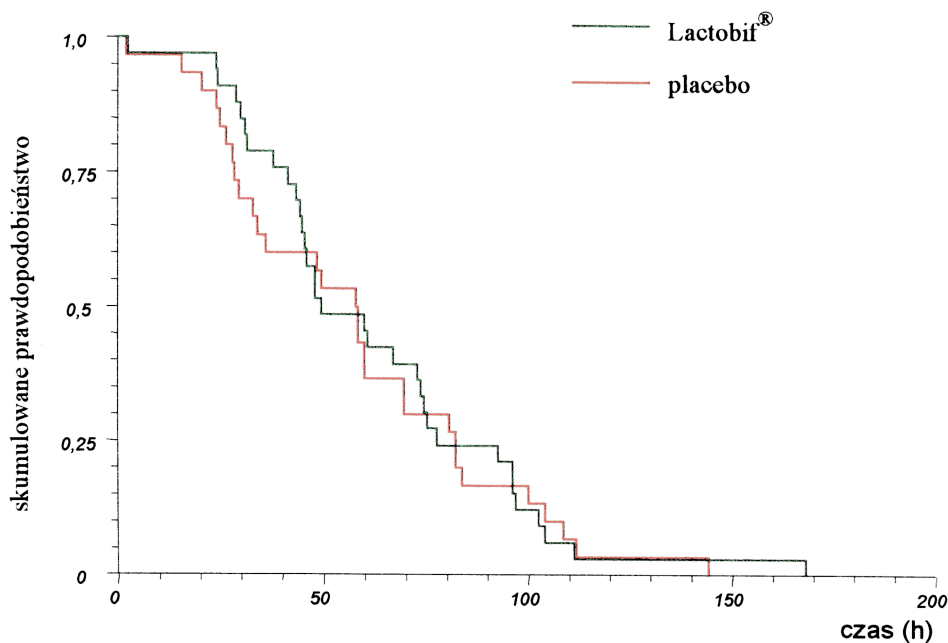
Nasilenie całego epizodu choroby oceniane wg skali Kapikiana wynosiło w grupie eksperymentalnej i kontrolnej, odpowiednio (średnia \pm odchylenie standardowe) $15,72 \pm 3,31$ i $16,6 \pm 2,14$ punktów ($p=0,45$; test Manna i Whitney'a) (ryc.6).



Ryc. 6. Nasilenie epizodu biegunkowego, oceniane wg skali Kapikiana, w zależności od wieku w grupie dzieci otrzymujących Lactobif[®] i placebo

Czas trwania biegunki w okresie stosowania interwencji nie wykazywał znamiennej statystycznie różnicy w grupie dzieci otrzymujących Lactobif[®] i placebo (odpowiednio: $62,13 \pm 33,4$ vs $57,68 \pm 33,8$ godziny; $p=0,6$; test t-Studenta). U dzieci leczonych Lactobifem[®] skumulowane prawdopodobieństwo ustąpienia biegunki nie różniło się istotnie statystycznie w porównaniu z takim prawdopodobieństwem w grupie kontrolnej (hazard

względny: 1,06; 95% przedział: 0,62–1,82; $p=0,897$; test logarytmiczny rang) (rys.7).



Ryc.7 Skumulowane prawdopodobieństwo utrzymywania się biegunki u dzieci otrzymujących Lactobif® oraz otrzymujących placebo w zależności od czasu obserwacji, przedstawione w postaci krzywych przeżycia Kaplana i Meiera ($p = 0,81$; test logarytmiczny rang). W porównaniu z grupą otrzymującą placebo, skumulowane prawdopodobieństwo ustąpienia biegunki u dzieci leczonych Lactobifem® nie różniło się istotnie statystycznie (hazard względny: 1,06; 95% przedział ufności: 0,62-1,82; $p=0,897$; dokładny test Fishera).

Czas nawadniania pozajelitowego nie różnił się znacząco w grupie eksperymentalnej w porównaniu z grupą kontrolną i wynosił odpowiednio: (średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe) $64,27 \pm 30,0$ vs $57,65 \pm 25,67$ godzin ($p=0,37$, test t-Studenta) (tab.6). Nie wykazano znaczącej statystycznie różnicy pomiędzy badanymi grupami co do średniej liczby stolców (ryc.8), wymiotów (ryc.9) i nasilenia epizodu w kolejnych dniach stosowania interwencji (ryc.10). Karmienie doustne rozpoczynano (średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe) odpowiednio po $10,46 \pm 5,27$ i

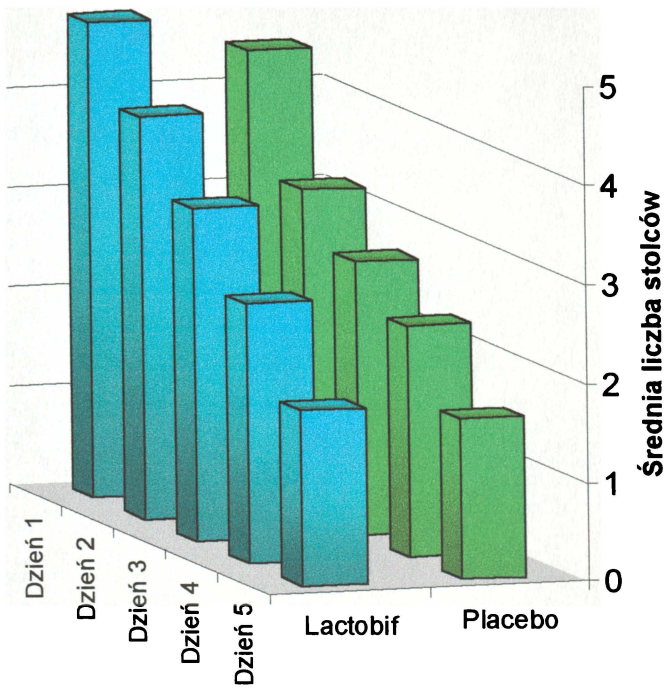
11,37±7,4 godzinach ($p=0,59$, test t-Studenta), a czas trwania hospitalizacji wynosił odpowiednio: 6,87±2,21 vs 6,03±1,95 dni ($p=0,12$; test t-Studenta).

Tabela 6. Charakterystyka przebiegu epizodu biegunkowego spowodowanego zakażeniem HRV w grupie eksperymentalnej i placebo.

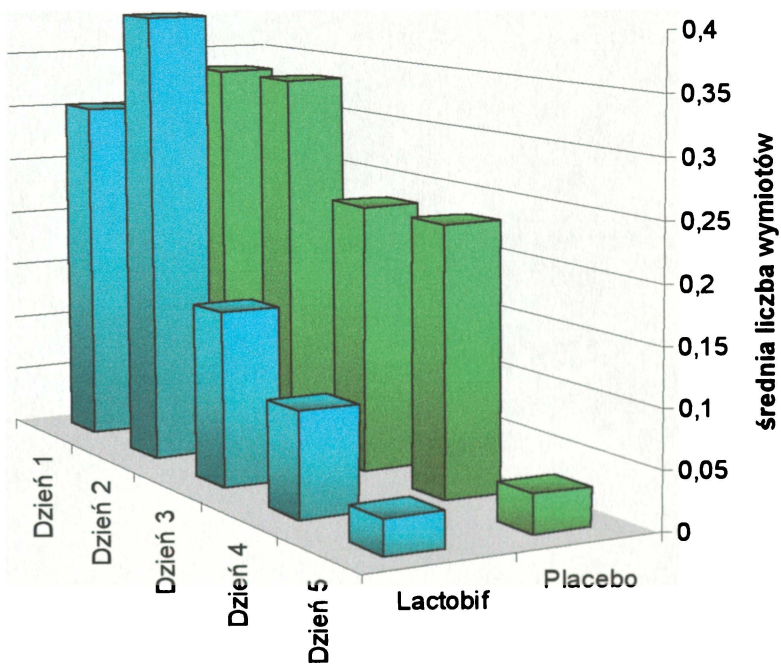
Objaw	Lactobif[®] (średnia; ±odchylenie standardowe)	Placebo (średnia; ±odchylenie standardowe)	<i>p (test</i> <i>t-Studenta)</i>
czas trwania biegunki (godziny)	62,13±33,4	57,68±33,8	0,6
maksymalna liczba stolców biegunkowych / dobę	4,78±3,53	3,4±2,28	0,66
liczba epizodów wymiotów / dobę	0,39±1,19	0,33±0,60	0,81
czas nawadniania pozajelitowego (godziny)	64,27±30,0	57,65±25,67	0,37

Lactobif[®] był dobrze tolerowany i w trakcie badania nie wystąpiły żadne działania niepożądane. U 15 (45,45%) chorych otrzymujących Lactobif[®] i u 9 (30%) z grupy placebo biegunka trwała dłużej niż 72 godziny od momentu rozpoczęcia interwencji (ryzyko względne: 1,5; 95% przedział ufności: 0,8-2,98). Nasilenie się biegunki w trakcie leczenia zaobserwowano odpowiednio u 3 (9%) i 2 (6,6%) chorych (ryzyko względne: 1,36; 95% przedział ufności: 0,3-6,5), a wymioty po 24 godzinach od rozpoczęcia leczenia odpowiednio u 5 (15%) i 6 (20%) pacjentów (RR: 0,76; 95% CI: 0,3-2,1).

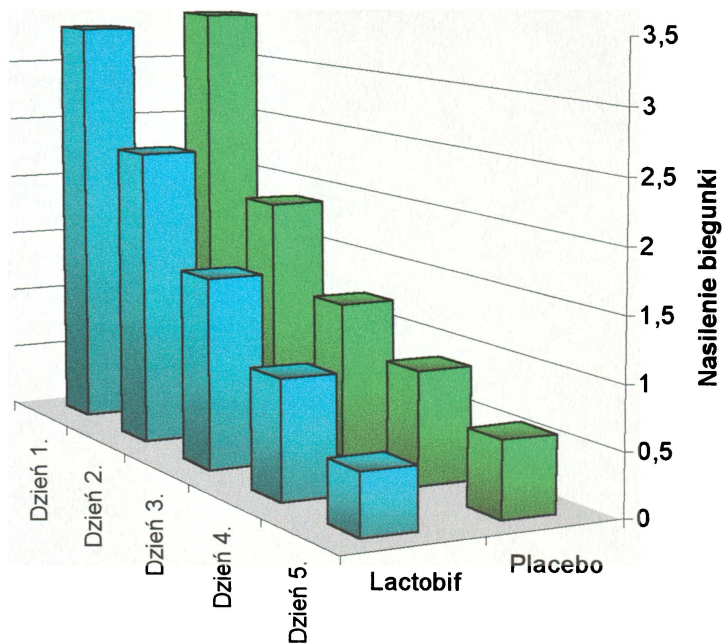
Tylko u 1 dziecka w grupie eksperymentalnej epizod biegunki od momentu rozpoczęcia interwencji trwał ponad 7 dni.



Ryc.8. Średnia liczba stolców w kolejnych dniach badania w badanych u grupach



Ryc.9. Średnia liczba epizodów wymiotów w kolejnych dniach badania w badanych grupach



Ryc.10. Nasilenie epizodu biegunkowego w kolejnych dniach badania w badanych grupach

5.3. Uzyskany materiał do badań

Pierwszą próbkę surowicy i stolca pobrano od wszystkich dzieci zakwalifikowanych do badania. Pierwsze próbki pobrano średnio w $1,6 \pm 0,47$ dobie. Drugą próbkę surowicy pobrano u 50 dzieci, które zgłosiły się na wizytę kontrolną. Drugie próbki pobierano średnio po $27,3 \pm 9,74$ dniach od zakończenia interwencji. Pierwszą próbkę stolca do hodowli *Bifidobacterium* pobrano od wszystkich dzieci, próbkę V. tylko od dzieci, które zgłosiły się do badania kontrolnego. W sumie u 39 dzieci pobrano wszystkie 5 próbek stolca, u sześciorga dzieci nie pobrano II. próbki, u 7 próbki trzeciej i u 6 dzieci próbki IV. Łącznie uzyskano 281 próbek stolca.

5.4. Wyniki posiewu bakteriologicznego stolca

Z pobranego materiału izolowano wiele różnych gatunków bakterii należących do fizjologicznej flory przewodu pokarmowego. Z posiewów w warunkach tlenowych hodowano m.in.: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter faecalis*. Natomiast na odpowiednich podłożach i w warunkach beztlenowych uzyskiwano wzrost takich drobnoustrojów jak: *Lactobacillus spp*, *Clostridium spp*, *Enterococcus spp*, *Petococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Bacteroides spp*, *Biophila spp*, *Eubacterium* i *Fusobacterium*. Obecność względnych i bezwzględnych bakterii beztlenowych świadczy o zachowaniu odpowiednich warunków hodowli. Bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* (niekoniecznie pochodzące z podawanego preparatu) stwierdzono w przynajmniej jednej próbce stolca u 11 (33,3%) dzieci z grupy eksperymentalnej i u 9 (30%) dzieci z grupy placebo (tab.7). W pierwszej próbce stolca (I) *Bifidobacterium* stwierdzano w 1 z 33 dzieci włączonych do grupy otrzymującej Lactobif[®] i u 2 z 30 dzieci w grupie placebo. Natomiast w badaniu kontrolnym *Bifidobacterium* było obecne odpowiednio u 5 z 22 i 4 z 28 dzieci. Test API 50 CHL potwierdził obecność badanego szczepu w jednej próbce stolca u 2 dzieci otrzymujących Lactobif[®] i u 1 dziecka z grupy placebo.

Tabela 7. Liczba dzieci w badanych grupach, u których stwierdzano obecność *Bifidobacterium* w pobieranych próbkach stolca

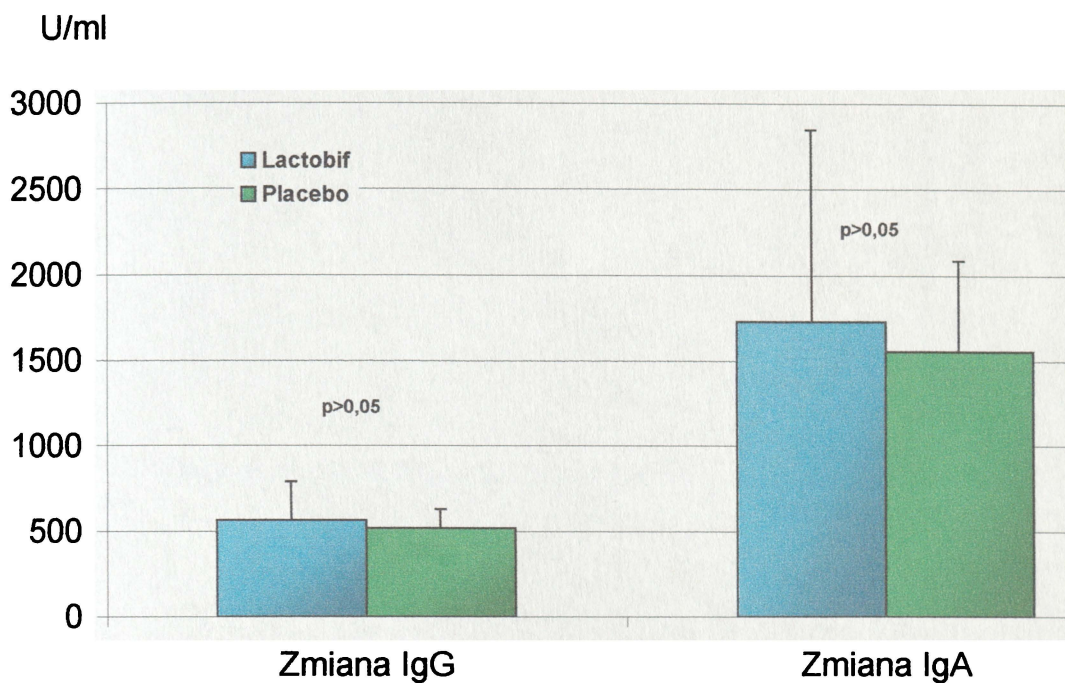
	Liczba dzieci, u których izolowano <i>Bifidobacterium</i> (%)				
	próbka I	próbka II	próbka III	próbka IV	próbka V
liczba dzieci, u których pobrano próbkę stolca	63	57	54	57	50
Lactobif [®]	1 (3%)	3 (5,2%)	3 (5,5%)	4 (7%)	5 (10%)
Placebo	2 (6%)	2 (3,5%)	6 (11%)	3 (5,2%)	4 (8%)
Razem:	3 (9%)	5 (8,7%)	9 (16,6%)	7 (12,2%)	9 (18%)

5.5. Stężenie swoistych immunoglobulin w surowicy

Swoiste przeciwciała przeciwko rotawirusom oznaczono w 47 z 50 par próbek surowic pobranych od dzieci, które zgłosiły się na badania kontrolne. Dwie surowice uległy hemolizie, a jedną utracono w trakcie transportu; w niekompletnych parach nie wykonywano oznaczeń. Wzrostu stężenia swoistych przeciwciał o 28% nie stwierdzono u 5 dzieci; 1 w grupie otrzymującej Lactobif[®] i 4 z grupy placebo.

W pierwszej próbce surowicy u 47 dzieci (20 otrzymujących Lactobif[®] i 27 z grupy placebo) stwierdzono niskie stężenia swoistych przeciwciał (średnia; 95% przedział ufności), zarówno w klasie IgA (odpowiednio: 1022,8 U/ml, 844,2-1201,5 i 980,5 U/ml, 928,5-1032,4; $p=0,49$; test Manna i Whitney'a), jak i IgG (odpowiednio: 238,2 U/ml, 165,8-310,5 i 265,7 U/ml, 160,3-371,1; $p=0,74$).

Zmiana stężenia IgA u dzieci otrzymujących Lactobif[®] ($n=18$) i placebo ($n=22$) wynosiła odpowiednio $1728,59 \pm 1117,0$ U/ml i $1555,41 \pm 528,77$ U/ml (średnia geometryczna \pm błąd standardowy). Zmiana stężenia IgG w badanych grupach wyniosła odpowiednio $561,89 \pm 223,48$ U/ml ($n=18$) i $518,99 \pm 110,05$ U/ml ($n=23$). Różnice wielkości zmian IgA i IgG w badanych grupach nie były znamienne statystycznie (wartość odpowiednio: 0,51 i 0,19; test Manna i Whitney'a) (rys.11).



Ryc. 11. Zmiany stężenia swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusowi klasy IgG i IgA oznaczonych na początku zakażenia i w okresie rekonwalescencji w obydwu badanych grupach wyrażone jako średnia geometryczna \pm SE.

6. DYSKUSJA

W ostatnich kilku latach opublikowano wiele artykułów dotyczących probiotyków i ich zastosowania w leczeniu i zapobieganiu różnym chorobom. Szczególnie dużo badań poświęcono leczeniu ostrej biegunki u niemowląt i małych dzieci. Większość badaczy koncentruje się na bieguncie spowodowanej zakażeniem rotawirusem, gdyż jest to najczęstszy czynnik etiologiczny ostrej biegunki w najmłodszej grupie wiekowej. Również w przedstawionej pracy, oceniającej skuteczność preparatu probiotycznego Lactobif[®], badaniem objęto tylko te dzieci, u których potwierdzono zakażenie HRV.

Na podstawie przeprowadzonego badania stwierdzono, że czas trwania biegunki rotawirusowej, od momentu rozpoczęcia interwencji, nie wykazywał istotnej statystycznie różnicy w grupie otrzymującej Lactobif[®] i placebo. U dzieci leczonych Lactobifem[®] skumulowane prawdopodobieństwo ustąpienia biegunki nie różniło się istotnie statystycznie w porównaniu do grupy placebo. Nie wykazano również, aby Lactobif[®] łagodził przebieg choroby i stymulował odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom mierzoną stężeniem swoistych przeciwciał w surowicy.

W 2001 roku Szajewska i Mrukowicz [167] przeprowadzili metaanalizę opublikowanych prac dotyczących skuteczności probiotyków w ostrej bieguncie u dzieci (10 badań z randomizacją przeprowadzonych w niezależnych ośrodkach metodą podwójnie ślepej próby z placebo). Wynika z niej, że spośród 7 badanych szczepów, korzystny efekt leczniczy w ostrej bieguncie rotawirusowej u niemowląt i małych dzieci wywiera tylko *L. rhamnosus* szczep GG (ATCC 53013). Szczep ten był przedmiotem 4 badań [62,75,81,153], które objęły łącznie 297 dzieci. Jego podawanie skraca czas trwania biegunki rotawirusowej średnio o 24,8 godziny [75,95,130] oraz czas wydalania HRV w stolcu [64], a także pobudza nieswoistą i antygenowo swoistą odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom [81]. Wydaje się, że działanie probiotyczne wykazuje także *L. acidophilus* LB (wchodzący w

skład preparatu Lactéol Forte, Francja) [28,29,157]. Wyniki niektórych badań sugerują korzystny wpływ na przebieg ostrej biegunki HRV u dzieci takich szczepów jak *Streptococcus thermophilus lactis*, *L. acidophilus* i *L. bulgaricus* [122]. Skuteczność *Saccharomyces boulardii* (preparat Enterol) w ostrej biegunce potwierdziło jedno badanie z randomizacją przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby u dzieci [23]. Należy podkreślić, że wszystkie wyżej omówione szczepy *Lactobacillus* są, jak podają autorzy prac, pochodzenia ludzkiego [29,75,80,122,157].

Bakterie należące do rodzaju *Bifidobacterium* wymieniane są zwykle jako drobnoustroje o właściwościach probiotycznych. *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum* i inne należą do prawidłowej mikroflory przewodu pokarmowego człowieka oraz znajdują się w wielu powszechnie spożywanych produktach i przetworach mlecznych (co może potwierdzać bezpieczeństwo ich stosowania). Niektóre szczepy *Bifidobacterium* izolowane od niemowląt wykazują działanie antagonistyczne wobec bakterii chorobotwórczych [94]. W modelu zwierzęcym (myszy) *Bifidobacterium bifidum* skracał czas i łagodził przebieg ostrej biegunki rotawirusowej, oraz skracał czas wydalania rotawirusa ze stolcem [44,45]. Wykazano także skuteczność *Bifidobacterium bifidum* podawanego łącznie z *Streptococcus thermophilus* w zapobieganiu szpitalnym zakażeniom HRV u dzieci [140].

W momencie rozpoczęcia badania, zgodnie z informacją podawaną przez producenta, Lactobif[®] powinien zawierać *Bifidobacterium bifidum*. Obecnie wiadomo, że preparat zawiera *Bifidobacterium ruminantium*, szczep wchodzący w skład fizjologicznej mikroflory przewodu pokarmowego cieląt a nie ludzi. Zwierzęce pochodzenie szczepu może być przyczyną braku jego skuteczności probiotycznej w ostrej biegunce rotawirusowej u dzieci. Dlatego ogromne znaczenie ma ściśle określenie przynależności rodzajowej i gatunkowej bakterii wykorzystywanych do produkcji tzw. „żywności funkcjonalnej”, a zwłaszcza do preparatów stosowanych w celach leczniczych. Należy przy tym uwzględnić nowe techniki badawcze stosowane w taksonomii tych drobnoustrojów. W wielu publikacjach omówiono sposoby identyfikacji szczepów LAB oraz metody oceny mikrobiologicznej ich właściwości probiotycznych [30,46,162,163]. Wiarygodną metodą identyfikacji szczepów bakterii są metody biologii molekularnej, a więc badanie homologii DNA lub

zastosowanie sond genetycznych komplementarnych do 16S lub 23S rRNA [73].

Bifidobacterium ruminantium nie jest jedynym szczepem, w stosunku do którego badania kliniczne nie potwierdziły działania probiotycznego w ostrej biegunce. W badaniach z randomizacją nie udało się wykazać, aby *L. acidophilus* [16,21] i *E. faecium* SF68 [111,176] powodowały znamienne skrócenie czasu trwania biegunki infekcyjnej, chociaż u niektórych dzieci otrzymujących probiotyk objawy choroby ustępowały nieco wcześniej niż w grupie placebo.

Część autorów podkreśla, że udokumentowane właściwości jednego, określonego gatunku są ściśle z nim związane i nie można ich przez analogię przenosić na cały rodzaj czy przypisywać innym, nawet bardzo blisko spokrewnionym bakteriom [99,102,134]. Właściwości typowe dla *Bifidobacterium bifidum* nie koniecznie są charakterystyczne także dla *Bifidobacterium ruminantium*, podobnie różnią się od siebie szczepy *Lactobacillus*. Każdy ze szczepów należy przebadać oddzielnie w celu określenia jego właściwości probiotycznych i korzyści wynikających z zastosowania klinicznego. Badania powinny dotyczyć ściśle określonych chorób [141].

W związku z uzyskaniem negatywnego wyniku badania, można się zastanawiać czy nie wynika on na przykład ze sposobu dawkowania i podawania preparatu. W badaniach nad zastosowaniem *Lactobacillus* GG w leczeniu ostrej biegunki probiotyk podawano 2 razy dziennie w dawce $0,5-2 \times 10^{10-11}$ CFU [75,76,153] lub jeden raz dziennie 10^{10-11} CFU [75]; podobnie w badaniu nad *Lactobacillus reuterii* dawka wynosiła $1 \times 10^{10-11}$ co 24 godziny [151]. W niniejszym badaniu przyjęto dawkowanie zgodne z zaleceniami producenta, uznając że jest to sposób, w jaki przyjmowany jest badany probiotyk przez stosujących go chorych. Zalecenia te nie różniły się od zasad dawkowania innych preparatów probiotycznych opisanych w piśmiennictwie medycznym [5,62,93,99,152]. W jednej z prac wykazano, że najlepsze efekty działania *Lactobacillus rhamnosus* GG można obserwować po podaniu go w jak najwcześniejszej fazie nawadniania dziecka [129]. Podanie pierwszej dawki Lactobifu® było zwykle przesunięte w czasie o kilka godzin w stosunku do rozpoczęcia nawadniania. Był to czas potrzebny na ustalenie etiologii i

uzyskanie zgody rodziców na udział dziecka w badaniu. Należy również podkreślić, że niemal wszystkie dzieci uczestniczące w badaniu były nawadniane pozajelitowo, podczas gdy w większości badań potwierdzających skuteczność probiotyków w leczeniu wspomagającym ostrej biegunki HRV stosowano DPN [62,75,153,157].

Jedną z cech świadczących o skuteczności probiotyków jest ich zdolność do przetrwania w przewodzie pokarmowym, czyli przede wszystkim odporność na trawienie. Wiele bakterii ginie w kwaśnym środowisku żołądka lub w dwunastnicy w wyniku działania żółci. Te, które nie posiadają zdolności do chociażby przejściowej kolonizacji lub namnażania w przewodzie pokarmowym szybko ulegają wydaleniu ze stolcem. Kolonizację można potwierdzić pobierając seryjnie bioptaty błony śluzowej lub próbki kału [1,5,149]. Wykazano, że również egzogenne szczepy posiadają zdolność do przejściowego kolonizowania przewodu pokarmowego człowieka [20]. W przeprowadzonym badaniu tylko u 20 z 63 (31,7 %; w grupie otrzymującej Lactobif[®] – 33,3%; w grupie kontrolnej – 30%) dzieci posiew stolca umożliwił izolację *Bifidobacterium spp.* Badanie mikrobiologiczne miało na celu wyłącznie wykazanie lub nie obecności *Bifidobacterium ruminantium* w stolcu. Nie przeprowadzono oceny ilościowej, jak również w większości przypadków nie stosowano nowoczesnych metod identyfikacji szczepów bakterii (test API 50 CHL). Identyfikacja opierała się na porównaniu cech fenotypowych w odniesieniu do hodowli wzorcowej, co nie jest metodą w pełni wiarygodną do określenia szczepu. Postępowanie takie wynikało z ograniczeń finansowych i było, niestety słabym punktem badania.

Jak wspomniano *Bifidobacterium* hodowano także ze stolców dzieci otrzymujących placebo (9 z 30), co może sugerować, że identyfikowane szczepy należały do endogennej flory badanych dzieci. Nasuwa się pytanie, czy obecność szczepów endogennych mogła wpłynąć na wynik badania? Należy stwierdzić, że uzyskane wyniki hodowli nie upowazniają do wyciągania jakichkolwiek wniosków z uwagi na małą liczbę dzieci, u których izolowano *Bifidobacterium* oraz fakt, że dodatnie hodowle uzyskiwano zwykle w 1.-2. spośród 5. pobieranych próbek stolca.

Wydaje się, że zdolność bakterii zawartych w preparacie Lactobif[®] do przetrwania pasażu przez przewód pokarmowy oraz do kolonizacji budzi duże

wątpliwości. Skuteczność probiotyczna drobnoustroju zależy w znacznej mierze od jego zdolności do wiązania się z receptorami i hamowania przylegania drobnoustrojów chorobotwórczych, syntezy substancji przeciwbakteryjnych oraz współzawodniczenia o substancje odżywcze [139,143]. Niemniej sama zdolność do kolonizacji nie jest warunkiem koniecznym dla skutecznego działania probiotycznego. Na przykład zabite, liofilizowane pałeczki *Lactobacillus acidophilus* LB i *Lactobacillus rhamnosus* GG skracają czas trwania ostrej biegunki HRV [157,168]. Wykazano jednak, że szczepy niekolonizujące nie stymulują odpowiedzi immunologicznej [80]. W przeprowadzonym badaniu nie wykazano, by Lactobif[®] stymulował odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom.

Przeprowadzone kilka lat temu w Anglii badania wielu preparatów i produktów, które powinny zawierać bakterie probiotyczne wykazało, że tylko w niektórych z nich liczba i rodzaj żywych drobnoustrojów odpowiadała informacji podanej przez producenta [68,69]. W świetle tych wyników należałoby zweryfikować skuteczność wszystkich dostępnych na rynku preparatów. Fazę kliniczną badań powinny poprzedzać wnikliwe badania mikrobiologiczne ze szczegółową identyfikacją szczepu za pomocą najnowszych metod diagnostycznych. Tylko ściśle zdefiniowane szczepy, które w badaniach laboratoryjnych i *in vitro* wykazują charakterystyczne właściwości probiotyczne powinny być dalej testowane w prawidłowo zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach klinicznych [39,138,143]. Niewątpliwie podstawą takich badań jest, tak jak to opisano w odniesieniu do prezentowanej pracy, odpowiedni dobór i zdefiniowanie badanej populacji, przyjęcie przejrzystego protokołu badania, ściśle określenie punktu końcowego oraz przeprowadzenie badania z randomizacją metodą podwójnie ślepej próby z placebo. Należy podkreślić, że dopiero pozytywny wynik dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych badań mikrobiologicznych i klinicznych stwarza wiarygodne podstawy do zalecania stosowania danego preparatu w leczeniu. Niektórzy autorzy postulują, aby wyniki badań zostały potwierdzone przez kilku niezależnych badaczy [57,134]. Oprócz pilnej potrzeby szybkiego ustalenia ścisłej przynależności gatunkowej i rodzajowej drobnoustrojów zawartych w produktach probiotycznych oraz udokumentowania ich działania, należy także prowadzić okresowe stałe badania żywotności bakterii i ich

zdolności do kolonizacji. Ma to szczególnie duże znaczenie w przypadku preparatów leczniczych, gdyż lekarz musi mieć pewność, że zalecany przez niego preparat jest rzeczywiście produktem spełniającym wymagania stawiane probiotykom i będzie skuteczny w określonych chorobach.

W ostrej bieguncie, zwłaszcza o dużym nasileniu, nawadnianie tylko płynami doustnymi nie zawsze przynosi oczekiwane efekty i chociaż zapobiega ciężkim powikłaniom, nie wpływa na czas trwania choroby i nie ogranicza liczby biegunkowych stolców. DPN jest bardzo skuteczną metodą leczenia odwodnienia umiarkowanego i średniego stopnia w przebiegu ostrej biegunki. W przypadku cięższego przebiegu i nasilonych objawów odwodnienia obowiązuje nawadnianie dożylne [4,127]. Konieczne w niektórych przypadkach leczenie szpitalne bywa źle akceptowane i może być przyczyną urazu psychicznego u chorego dziecka i jego opiekunów. Poza tym każdy dzień hospitalizacji pociąga za sobą koszty bezpośrednie i pośrednie pobytu w szpitalu. Skrócenie czasu trwania ostrej biegunki, poprawienie stanu odżywienia chorego, skrócenie czasu hospitalizacji lub zapobieganie bieguncie, dzięki stosowaniu probiotyku o udowodnionej skuteczności, miałyby niewątpliwie korzystny wpływ na wiele aspektów związanych z problemem ostrej biegunki rotawirusowej.

Probiotyk posiadający właściwości zbliżone do wykazywanych przez *Lactobacillus rhamnosus* GG, podawany w ostrej fazie biegunki rotawirusowej powinien wpłynąć na skrócenie czasu jej trwania, co umożliwi wcześniejszy wypis dziecka do domu, a tym samym spowoduje obniżenie kosztów leczenia szpitalnego chorych dzieci. Korzystną cechą probiotyków jest ich bezpieczeństwo i mała cena. Preparaty probiotyczne można z powodzeniem stosować ambulatoryjnie, co w przypadku skutecznej terapii powinno zmniejszyć liczbę dzieci hospitalizowanych z powodu ostrej biegunki. Przyniosło by to niewątpliwie korzyści ekonomiczne i społeczne. Hipoteza ta wymaga jednak sprawdzenia w odrębnym prawidłowo zaplanowanym badaniu klinicznym.

Nie każdy szczep z rodzaju *Bifidobacterium* izolowany z flory przewodu pokarmowego człowieka spełnia kryteria mikrobiologiczne i wykazuje właściwości charakterystyczne dla probiotyków [94]. Szczep

Bifidobacterium wchodzący w skład preparatu Lactobif[®] nie spełnia większości wymagań stawianych probiotykom (patrz 2.5):

1. *Bifidobacterium ruminantium* nie występuje typowo u ludzi, natomiast zaliczany jest do mikroflory zwierzęcej i występuje u cieląt [15];
2. Można przypuszczać, że *Bifidobacterium ruminantium* nie kolonizuje jelita i szybko ginie w przewodzie pokarmowym człowieka;
3. *Bifidobacterium ruminantium* nie wykazuje korzystnego działania klinicznego wobec jednego z najczęściej występujących patogenów przewodu pokarmowego u dzieci – rotawirusa;
4. Prawdopodobnie przeprowadzone badanie kliniczne nie potwierdziło działania probiotycznego preparatu Lactobif[®] w ostrej biegunce rotawirusowej.

Wyniki przeprowadzonego badania mają duże znaczenie praktyczne. Nie wykazano skuteczności preparatu Lactobif[®] w leczeniu ostrej biegunki rotawirusowej u dzieci, dlatego preparat ten nie powinien być stosowany w praktyce. Jeśli zostanie zalecony, przyczyni się przede wszystkim do zwiększenia kosztu terapii (cena opakowania wystarczającego na jedną kurację biegunki wynosi 12 – 13 zł), natomiast prawdopodobieństwo uzyskania korzystnego efektu jest bardzo małe. Problem Lactobifu[®] może wkrótce stać się nieaktualny, gdyż po uzyskaniu wyników przeprowadzonego badania producent zadeklarował wycofanie preparatu z produkcji.

7. WNIOSKI

Na podstawie wyników przeprowadzonego badania wyciągnięto następujące wnioski:

1. Preparat Lactobif[®] podawany 2 razy dziennie nie skraca czasu trwania biegunki rotawirusowej u dzieci w wieku od 4 tygodni do 24 miesięcy.
2. Preparat Lactobif[®] w porównaniu z placebo nie zmniejsza nasilenia objawów biegunki rotawirusowej.
3. Nie wykazano, aby preparat Lactobif[®] stymulował odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom mierzoną stężeniem swoistych przeciwciał w surowicy w klasie IgG i IgA w okresie rekonwalescencji po ostrej fazie choroby.
4. W praktyce w leczeniu ostrej biegunki należy stosować wyłącznie probiotyki o skuteczności udowodnionej w prawidłowo zaplanowanych i przeprowadzonych badaniach klinicznych.

8. STRESZCZENIE

Wyniki licznych kontrolowanych badań klinicznych wskazują, że stosowanie pewnych probiotyków wpływa istotnie na skrócenie czasu trwania ostrej biegunki u niemowląt i małych dzieci. Zwłaszcza w przypadku zakażeń rotawirusowych ten sposób leczenia może stanowić cenne uzupełnienie terapii płynowej. Jak dotąd, najkorzystniejsze działanie wykazano w stosunku do szczepu *Lactobacillus GG*. Nie jest on jednak dostępny w Polsce, gdzie 70% lekarzy stosuje w ostrej biegunce inne dostępne na rynku probiotyki. Jednym z nich jest Lactobif[®] zawierający szczep *Bifidobacterium ruminantium*, którego skuteczność nie została potwierdzona w badaniach klinicznych przeprowadzonych metodą podwójnie ślepej próby z placebo.

Celem pracy była ocena skuteczności Lactobifu[®] w leczeniu ostrej biegunki rotawirusowej u dzieci, a w szczególności jego wpływu na czas trwania choroby.

Randomizowanym badaniem przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby z placebo objęto dzieci hospitalizowane w Klinice Pediatrii, Gastroenterologii i Żywienia, w wieku od 1. do 24. miesięcy, chore na ostrą biegunkę rotawirusową (> 3 stolców wolnych lub płynnych w ciągu 24 godzin), trwającą nie dłużej niż 48 godzin do momentu włączenia do badania. Dzieci kwalifikowano losowo do jednej z 2 grup, w których poza standardowym leczeniem (nawadnianie i realimentacja), otrzymywały one doustnie dwa razy dziennie przez 5 dni: (1) Lactobif[®] (10⁹ CFU) lub (2) placebo. Za główny punkt końcowy badania uznano ocenę czasu trwania biegunki. Jako hipotezę badawczą przyjęto założenie, że podawanie preparatu Lactobif[®] dzieciom w wieku od 4. tygodnia do 24. miesiąca życia chorym na ostrą biegunkę o etiologii rotawirusowej skraca czas jej trwania przynajmniej o 24 godziny. Do wtórnych punktów końcowych zaliczono: (1) biegunkę trwającą >72 godzin po rozpoczęciu interwencji; (2) wymioty utrzymujące się >24 godzin po rozpoczęciu interwencji; (3) biegunkę trwającą >7 dni od czasu pojawienia się pierwszych objawów; (4) nasilenie biegunki; (5) zmianę stężenia swoistych przeciwciał przeciwko HRV w surowicy w klasie IgG i IgA

w okresie rekonwalescencji (3-4 tygodni po zakwalifikowaniu do badania) w stosunku do stężenia w ostrej fazie choroby; (6) działania niepożądane. Do oceny ciężkości epizodu biegunki stosowano 20-punktową skalę Kapikiana.

Do badania włączono 63 dzieci (29 dziewczynek i 34 chłopców, średni wiek $12,98 \pm 5,03$ miesięcy), spośród których 33 otrzymywało Lactobif[®], a 30 placebo. Obie grupy nie różniły się istotnie pod względem wieku, płci, czasu trwania biegunki przed włączeniem do badania oraz stopnia odwodnienia. Całkowity czas trwania biegunki od momentu rozpoczęcia interwencji nie wykazywał istotnej statystycznie różnicy w grupie otrzymującej Lactobif[®] i placebo (odpowiednio $62,13 \pm 33,4$ vs $57,68 \pm 33,8$ godziny; $p=0,6$; test t-Studenta). U dzieci leczonych Lactobifem[®] skumulowane prawdopodobieństwo ustąpienia biegunki nie różniło się istotnie statystycznie w porównaniu z takim prawdopodobieństwem w grupie kontrolnej (hazard względny: 1,06; 95% przedział ufności: 0,62–1,82; $p=0,897$, test logarytmiczny rang). Nasilenie epizodu biegunkowego u dzieci otrzymujących Lactobif[®] oceniono na $15,72 \pm 3,31$, a w grupie placebo na $16,6 \pm 2,14$ punkty ($p=0,45$; test Manna i Whitney'a). U dzieci włączonych do badania nie obserwowano działań niepożądanych.

Swoiste przeciwciała przeciwko rotawirusom oznaczono u 47 spośród 50 dzieci, które zgłosiły się na badania kontrolne. U pięciorga dzieci (1 w grupie otrzymującej Lactobif[®] i 4 w grupie placebo) nie stwierdzono zwiększenia miana swoistych przeciwciał w 2. próbce surowicy. Zmianę stężenia swoistych przeciwciał określano jako różnicę między próbką 1. i 2 (średnia geometryczna; \pm błąd standardowy). Zmiana stężenia IgA u dzieci otrzymujących Lactobif[®] ($n=18$) i placebo ($n=22$) wynosiła odpowiednio $1728,59 \pm 1117,0$ U/ml i $1555,41 \pm 528,77$ U/ml (średnia geometryczna \pm błąd standardowy). Zmiana stężenia IgG w badanych grupach wyniosła odpowiednio $561,89 \pm 223,48$ U/ml ($n=18$) i $518,99 \pm 110,05$ U/ml ($n=23$). Różnice wielkości zmian IgA i IgG w badanych grupach nie były znamienne statystycznie (wartość odpowiednio: 0,51 i 0,19; test Manna i Whitney'a).

Przeprowadzone badanie nie potwierdziło skuteczności Lactobifu[®] (*Bifidocabterium ruminantium*) w leczeniu ostrej biegunki rotawirusowej u małych dzieci. Stwierdzono, że czas trwania biegunki od momentu rozpoczęcia

interwencji nie wykazywał istotnej statystycznie różnicy w grupie otrzymującej Lactobif[®] i placebo. U dzieci leczonych Lactobifem[®] skumulowane prawdopodobieństwo ustąpienia biegunki nie różniło się istotnie statystycznie w porównaniu do grupy placebo. Nie wykazano również, aby Lactobif[®] łagodził przebieg choroby i stymulował odpowiedź immunologiczną przeciwko rotawirusom mierzona stężeniem swoistych przeciwciał w surowicy. Należy podkreślić, że w praktyce klinicznej powinny być stosowane wyłącznie te probiotyki, których skuteczność została udowodniona w prawidłowo przeprowadzonych badaniach klinicznych.

9. SPIS RYCIN

Ryc.1	Zdjęcie przedstawiające preparat „Lactobif” (<i>Bifidobacterium ruminantium</i> lub placebo) przygotowany do potrzeb badania	Str.28
Ryc.2	Kolonie <i>Bifidobacterium ruminantium</i> na podłożu wzrostowym MRS. Szczep tworzy kremowo-białe	Str.33
Ryc.3	Preparat <i>Bifidobacterium ruminantium</i> po wybarwieniu metodą Grama (obraz z mikroskopu optycznego; powiększenie 100x)	Str.33
Ryc.4a	Krzywa wzorcowa stężenia swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusowi klasy IgG w surowicy kontrolnej	Str.37
Ryc.4b	Krzywa wzorcowa stężenia swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusowi klasy IgA w surowicy kontrolnej	Str.38
Ryc.5	Diagram przedstawiający kolejne etapy rekrutacji i randomizacji dzieci do badania	Str.40
Ryc.6	Nasilenie epizodu biegunkowego, oceniane wg skali Kapikiana, w grupie dzieci otrzymujących Lactobif® i placebo	Str.42
Ryc.7	Skumulowane prawdopodobieństwo utrzymywania się biegunki u dzieci otrzymujących Lactobif® oraz otrzymujących placebo w zależności od czasu obserwacji, przedstawione w postaci krzywych przeżycia Kaplana i Meiera ($p=0,81$, test logarytmiczny rang).	Str.43
Ryc.8	Średnia liczna stolców w kolejnych dniach badania w badanych grupach	Str.45
Ryc.9	Średnia liczna epizodów wymiotów w kolejnych dniach badania w badanych grupach	Str.45
Ryc.10	Nasilenie epizodu biegunkowego w kolejnych dniach badania w badanych grupach	Str.46
Ryc.11	Zmiany stężenia swoistych przeciwciał przeciwko rotawirusowi klasy IgG i IgA oznaczanych na początku zakażenia i w okresie rekonwalescencji w obydwu badanych grupach wyrażone jako średnia geometryczna \pm SE.	Str.49

10. SPIS TABEL

Tabela 1.	Szczepy probiotyczne, których skuteczność w leczeniu lub profilaktyce ostrej biegunki potwierdzono w badaniach z randomizacją	Str.16.
Tabela 2.	Plan badania	Str.29
Tabela 3.	Punktowa skala do oceny nasilenia biegunki rotawirusowej wg Kapikiana	Str.30
Tabela 4.	Karta codziennej obserwacji pacjenta	Str.31
Tabela 5.	Charakterystyka badanych grup pacjentów przed rozpoczęciem interwencji	Str.41
Tabela 6.	Charakterystyka przebiegu epizodu biegunkowego spowodowanego zakażeniem HRV w grupie eksperymentalnej i placebo.	Str.44
Tabela 7.	Liczba dzieci w badanych grupach, u których stwierdzano obecność <i>Bifidobacterium</i> w pobieranych próbkach stolca	Str.47

11. PIŚMIENICTWO

1. Alander W, Korpela R, Saxelin M. i in. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. Lett Appl Microbiol 1997; 24: 361-364
2. Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. J Infect Dis 2001; 32: 1567-1576
3. Andrade GP, Lima LRAV, Hoshino-Shimizu S i in. Humoral immunity patterns based on antibody reactivity to rotavirus antigens in Brazilian children under 5 years of age. J Med. Virol 1996; 49: 212-217
4. Armon K, Stephenson T, MacFaul R i in. An evidence and consensus based guideline for acute diarrhoea management. Arch Dis Child, 2001; 85: 132-142
5. Arvola T, Laiho K, Torkkeli S i in. Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. Pediatrics 1999; 104: 64-67
6. Axelrod J, Keusch FT, Bottone E i in. Endocarditis caused by *Lactobacillus plantarum*. Ann Int Med. 1973; 78: 33-37
7. Bardowski J. Wynik analizy mikrobiologicznej i genetycznej pałeczek kwasu mlekowego używanych do wytwarzania preparatu Lactobif[®] – wynik ekspertyzy dla Wytwórni Surowic i Szczepionek Biomed w Krakowie
8. Bayer AS, Chow AW, Betts D i in. Lactobacillemia: report of nine cases. AM J Med. 1978; 64: 808-812
9. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. Gut 1998; 42: 2-7
10. Bern C, Martines J, de Zoysa I i in. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten year update. Bull World Health Organ 1992; 70: 705-714
11. Berner R, Schumacher RF, Hmeister S, Forster J. Occurance and impact of community-acquired and nosocomial rotavirus infection – a hospital-based study over 10 years. Acta Pediatr 1999; 426(Suppl): 48-52
12. Bernes GL, Doyle LW, Hewson PH i in. A randomized trial of oral gammaglobulin in low-birth-weight infants infected with rotavirus. Lancet 1982; 1: 1371-1373
13. Bernstein DI, McNeal MM, Schiff GM i in. Induction and persistence of local rotavirus antibodies in relation to serum antibodies. J Med. Virol 1989; 28: 90-95
14. Bernstein DI, Sander DS., Smith VE i in. Protection from rotavirus reinfection: 2-year prospective study. J Infect Dis 1991; 164: 277-283
15. Biavati B, Mattarelli P. *Bifidobacterium ruminantium* sp.nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp.nov. from the rumen of cattle.

16. Bin LX. Etude controlee du Lacteol Fort sachets versus furazolidone ou berberine dans le traitement des diarrhees aiguës de l'enfant. [Controlled clinical trial of Lacteol Fort sachets versus furazolidone of berberine in the treatment of acute diarrhea in children] Ann Pediatr (Paris) 1995; 42: 369-401
17. Bishop RF, Barnes GL, Cipriani E i in. Clinical immunity after neonatal rotavirus infection. A prospective longitudinal study in young children. N Engl J Med. 1983; 309: 72-76
18. Bishop RF, Cipriani E, Lund JS i in. Estimation of rotavirus immunoglobulin G antibodies in human serum samples by enzyme-linked immunosorbent assay: expression of results as units derived from standard curve. J Clin Microbiol. 1984; 19: 447-452
19. Blacklow NR, Greenberg HB. Viral gastroenteritis. N Engl J Med. 1991; 325: 252-264
20. Bouhnik Y, Pochart P, Marteau P i in. Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. Gastroenterology 1992; 102: 875-878
21. Bouulloche J, Mouterde O, Mallet E. Management of acute diarrhoea in infants and young children. Controlled study of the antidiarrhoeal efficacy of killed *L. acidophilus* (LB strain) versus a placebo and a reference drug (loperamid). Ann Pediatr (Paris) 1994; 41: 457-463
22. Burns JW, Siadat-Pajouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. Science 1996; 272: 104-107
23. Cetina-Sauri G, Sierra Basto G. Evaluation therapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez des enfants souffrant de diarrhee aigüe. Ann Pediatr 1994; 41: 1-7
24. Chiang BL, Sheih YH, Wang LH i in. Enhancing immunity by dietary consumption of probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. Eur J Clin Nutr 2000; 54: 849-855
25. CHOICE Study Group. Multicenter, randomized, double-blind clinical trial to evaluate the efficacy and safety of reduced osmolarity oral rehydration salts solution in children with acute watery diarrhea. Pediatrics 2001; 107: 613-618
26. Ciarlet M., Estes MK. Rotavirus and calicivirus infections of the gastrointestinal tract. Curr Opin Gastroenterol 2001; 17: 10-16
27. Clemens J, Rao M, Ahmed F i in. Breast-feeding and risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponements? Pediatrics 1993; 92: 680-685
28. Coconnier MH, Bernet MF, Chauvière G i in. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. J Diarrhoeal Dis Res 1993; 11: 235-242

29. Coconnier MH, Liévin V, Bernet-Camard MF i in. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1997; 41: 1046-1052
30. Collins JK, Thornton G, Sullivan GD. Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J* 1998; 8: 487-490
31. Coulson BS, Grimwood K, Bishop RF i in. Evaluation of end-point titration, single dilution and capture enzyme immunoassays for measurement of antirotaviral IgA and IgM in infantile secretions and serum. *J Virol Methods* 1989; 53: 53-66
32. Coulson BS, Grimwood K, Hudson IL i in. Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1678-1684
33. Coulson BS, Grimwood K, Masendycz PJ i in. Comparison of rotavirus immunoglobulin A coproconversion with other indices of rotavirus infection in longitudinal study in childhood. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1367-1374
34. Davidson GP, Butler RN. Probiotic in pediatric gastrointestinal disorders. *Current Opinion in Gastroenterology* 2000; 12: 477-481
35. Davidson GP, Hogg R, Kirubakaran C. Serum and intestinal immune response to rotavirus enteritis in children. *Infect Immun* 1983; 40: 447-452
36. Davidson GP, Tam J, Kirubakaran C. Passive protection against symptomatic hospital acquired rotavirus infection in India and Hong Kong. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 19: 351
37. Davidson GP, Whyte PBD, Daniels E i in. Passive immunization of children with bovine colostrum containing antibodies to human rotavirus. *Lancet* 1989; 2: 709-712
38. Dennehy PH, Nelson SM, Spangenberg S i in. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized children. *J Infect Dis* 2001; 184: 10-15
39. De Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhoea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 405-411
40. Desenclos JC, Rebiere I, Letrillard L i in. Diarrhoea-related morbidity and rotavirus infection in France. *Acta Pediatr* 1999; 426(Suppl): 42-47
41. De Simone C, Ciardi A, Grassi A i in. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1992; 14: 331-340
42. Djuretic T, Ramsay M., Gay N i in. An estimate of the proportion of diarrhoeal disease episodes seen by general practitioners attributable to rotavirus in children under 5 y of age in England and Wales. *Acta Pediatr* 1998; 87: 1-4
43. Dokumentacja dotycząca preparatu Lactobif przekazana przez Wytwórnię Surowic i Szczepionek Biomed w Krakowie
44. Duffy LC, Zielesny MA, Riepenhoff-Talty M i in. Effectiveness of

- Bifidobacterium bifidum* in mediating the clinical course of murine rotavirus diarrhea. *Pediatr Res* 1994; 35: 690-695
45. Duffy LC, Zielezny MA, Riepenhoff-Talty M i in. Reduction of virus shedding by *B. bifidum* in experimentally induced MRV infection. Statistical application for ELISA. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 2334-2340
 46. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L i in. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Suppl): 386S-392S
 47. Estes MK. Rotaviruses and their replication. W: W: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. III wydanie, Philadelphia, New York: Lippincot-Raven, 1996: 1625-1655
 48. Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989;54:410-439
 49. Feng N, Burns JW, Bracy L i in. Comparison of mucosal and systemic humoral immune responses and subsequent protection in mice orally inoculated with a homologous or a heterologous rotavirus. *J Virol* 1994; 68: 7766-7773
 50. Frühwirth M., Karmaus W, Moll-Schüler I i in. A prospective evaluation of community acquired gastroenteritis in paediatric practices: impact and disease burden of rotavirus infection. *Arch Dis Child* 2001; 84: 393-397
 51. Fuller R. Probiotics in man and animals. A review. *J App Bacteriol* 1989; 66:365-378
 52. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991;32: 439-442
 53. Gilger MA, Matson DO, Conner ME i in. Extraintestinal rotavirus infections in children with immunodeficiency. *J Pediatr* 1992; 120: 912-917
 54. Glass RI, Bresee JS, Parashar UD i in. First rotavirus vaccine licensed: Is there really a need? *Acta Pediatr* 1999; 426(Suppl): 2-8
 55. Glass RI, Gentsch J, Smith JC: Rotavirus vaccines: success by reassortment? *Science* 1994; 265: 1389-1391
 56. Glass RI, Lew JF, Gangarosa RE i in. Estimates morbidity and mortality rates for diarrheal diseases in American children. *J Pediatr* 1991; 118: 27-33
 57. Goldin BR, Salminen S: Lactic acid bacteria and gut mucosal barrier function. *Gastroenterology Inter* 1998; 11: 69-73
 58. Gościński G, Sobieszkańska B i in. Rotawirusy u dzieci hospitalizowanych w klinikach Wrocławia. *Przeg Lek* 1990; 47:682-685
 59. Gothefors L, Wadell G, Juto P i in. Prolonged efficacy of rhesus rotavirus vaccine in Swedish children. *J Infect Dis* 1989; 159: 753-757
 60. Grimwood K, Lund JCS, Coulson BS i in. Comparison of serum and mucosal antibody responses following severe acute rotavirus gastroenteritis in young children. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 732-738
 61. Grönlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in

- intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 19-25
62. Guandalini S, Pensabene L, Abu Zikri M. i in. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter european trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 54-60
 63. Guarino A, Canani RB, Russo S i in. Oral immunoglobulins for treatment of acute rotaviral gastroenteritis. *Pediatrics* 1994; 93: 12-16
 64. Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI i in. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25: 516-519
 65. Guèrin-Danan C, Andrieux C, Popot F i in. Pattern of metabolism and composition of the fecal microflora in infants 10 to 18 months old from day care centers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 25: 281-289
 66. Guerrant RL, Bobak DA. Bacterial and protozoal gastroenteritis. *N Engl J Med*. 1991; 325: 327-340
 67. Gurwith M, Wenman W, Hinde D i in. A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. *J Infect Dis* 1981; 144: 218-224
 68. Hamilton-Miller JMT: Probiotics used in trials should be independently checked microbiologically. (Letter) *BMJ* 1999; 319: 190
 69. Hamilton-Miller JMT, Shah S, Smith CT. "Probiotic" remedies are not what they seem. *BMJ* 1996; 312: 55-56
 70. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC i in. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 61-67
 71. Hjelt K, Graubelle PC, Schiøtz PO i in. Intestinal and serum immune response to a naturally acquired rotavirus gastroenteritis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; 4: 60-66
 72. Ho MS, Glass RI, Pinsky PF i in. Diarrheal deaths in American children: Are they preventable? *JAMA* 1988; 260: 3281-3285
 73. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R i in. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Suppl): 365S-373S
 74. Isolauri E, Joensuu J, Soumalainen H i in. Improved immunogenicity of oral D_xRRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine*, 1995; 13: 310-312
 75. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T i in. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus Casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhoea in children. *Pediatrics* 1991; 88: 90-96
 76. Isolauri E, Kaila M., Mykkänen H i in. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 2595-2600
 77. Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 1996; 59: 171-200

78. Jin S, Kilgore PE, Holman RC i in. Trends in hospitalizations for diarrhea in United States children from 1979 through 1992: estimates of morbidity associated with rotavirus. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 397-404
79. Johansen K, Bennet R, Bondesson K. Incidence and estimates of disease burden of rotavirus in Sweden. *Acta Pediatr* 1999; 426(Suppl): 20-23
80. Kaila M., Isolauri E, Saxelin M i in. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Arch Dis Child* 1995; 72: 51-53
81. Kaila M., Isolauri E, Virtanen E i in. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human Lactobacillus strain. *Pediatr Res* 1992; 32: 141-144
82. Kalliomaki M., Salminen S, Arvilommi H i in. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-1079
83. Kapikian AZ. Viral gastroenteritis. *JAMA* 1993; 269: 627-630
84. Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. W: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. III wydanie, Philadelphia, New York: Lippincot-Raven, 1996: 1657-1708
85. Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Perez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent Rhesus Rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis* 1996; 174(Suppl):S65-72
86. Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG i in. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N Engl J Med*. 1976; 294: 965-972
87. Kilgore PE, Holman RC, Clarke MJ i in. Trends of diarrheal disease-associated mortality in US children, 1968 through 1991. *JAMA* 1995; 11: 1143-1148
88. Klaenhammer TR (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-349
89. Kołakowska T, Czerwionka-Szaflarska M. Rotawirusy w ostrych zespołach biegunkowych u niemowląt i małych dzieci. *Wiad Lek* 1993; 46: 274-278
90. Langhendries JP, Detry J, van Hees J i in. Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21: 177-181
91. Lasek W: Układ odpornościowy związany z błonami śluzowymi. W: *Immunologia*. Pod red. Jakóbiśiak M., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2000: 336-354
92. Levy J. The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (Suppl): S8-S10
93. Lidbeck A, Gustafsson JA, Nord CE. Impact of Lactobacillus acidophilus supplements on the human oropharyngeal and intestinal microflora. *Scand J Infect Dis* 1987; 19: 531-537

94. Lièvin V, Peiffer I, Hudault F i in. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646-652
95. Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY i in. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1994; 10: 55-64
96. Ljungh A: Bacterial infections of the small intestine and colon. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 43-52
97. Łukasik E, Rusek-Zychma M., Łukasik M. i in. Diagnostyka i klinika ostrych biegunek rotawirusowych u dzieci hospitalizowanych w Śląskim Centrum Pediatrii w Zabrze w latach 1997-2000. *Pediatrics Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka* 2001; 3: 237-244
98. Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 179-185
99. Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M i in. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 333-338
100. Malin M., Suomalainen H, Saxelin M. i in. Promotion of IgA immune response in patient with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 1996; 40: 137-145
101. Marchand J, Vandenplas Y. Micro-organisms administered in the benefit of the host: myths and facts. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12: 1077-1088
102. Marteau PR, de Vrese M., Cellier CJ i in. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Suppl): 430S-436S
103. Martines J, Philips M, Feachem RG: Diarrheal diseases. W: Jamison Dt, Mosley WH, eds *Evolving health sector priorities in developing countries*. Washington, DC: World Bank, 1991: 1-49
104. Matson DO. Science, prevention, and practice: II preventing infectious diseases: concurrent: individual: viral gastroenteritis in day-care settings: epidemiology and new developments. *Pediatrics* 1994; 94 (Suppl): 999-1001
105. Matson DO, O'Ryan ML, Herrera I i in. Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *J Infect Dis* 1993; 167: 577-583
106. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN i in. A randomised placebo-controlled trial of *Sacharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA* 1994; 271: 1913-1918
107. Mendis L, Senanayake S. Serum and coproantibody responses to rotavirus infection in children during the first two years of life. *J Diarrhoeal Dis Res* 1993; 11: 75-81

108. Metchnikoff E. The prolongation of life. New York: GP Putnam's Sons; 1907
109. Middleton PJ, Szymanski MT, Petric M. Viruses associated with acute gastroenteritis in young children. *Am J Dis Child* 1997; 131: 733-737
110. Miettinen M., Vuopio-Varkila J, Varkila K. Production of human necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1996; 5403-5406
111. Mitra AK, Rabbani GH. A double-blind, controlled trial of Bioflorin (*Streptococcus faecium* SF 68) in adults with acute diarrhoea due to *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 1990; 99: 1149-1152
112. Mrukowicz JZ. Tolerancja i immunogenność atenuowanej szczepionki rotawirusowej typu 4 (ST3xUK) u dzieci i dorosłych. Praca doktorska. CMUJ. Kraków 1998.
113. Mrukowicz JZ, Krobicka B, Duplaga M i in. The epidemiology and impact of rotavirus diarrhoea in Poland. *Acta Paediatr* 1999 (Suppl); 426: 53-60
114. Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS i in. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med.*, 2001; 344: 564-572
115. Offit P.A. Rotaviruses: immunological determinants of protection against infection and disease. *Advances in virus research* 1994; 44: 161-202
116. Oishi I, Kimura T, Murakami T i in. Serial observations of chronic rotavirus infection in an immunodeficient child. *Microbiol Immunol* 1991; 35: 953-961
117. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M. i in. Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus GG*. *Ann Med.* 1990; 22: 53-56
118. O'Ryan ML, Matson DO, Estes MK i in. Anti-rotavirus G type-specific and isotype-specific antibodies in children with natural rotavirus infections. *J Infect Dis* 1994; 169: 504-511
119. O'Ryan ML, Matson DO, Pickering LK i in. Acquisition of antibody protective against rotavirus infection in illness. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 890-895
120. Pacyna J, Siwek K, Terry SJ i in. Survival of rotavirus antibody activity derived from bovine colostrum after passage through the human gastrointestinal tract. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 162-167
121. Pang XL, Joenesuu J, Vesikari T. Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial. *Pediatr Infect Dis J* 1999; 18: 420-426
122. Pearce JL, Hamilton JR. Controlled trial of orally administered *lactobacilli* in acute infantile diarrhea. *J Pediatr* 1974; 84: 261-262
123. Pessi T, Sutas Y, Hurme i in. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus GG*. *Clin Exp Immunol*

124. Pichichero ME. Effect of breast-feeding on oral rhesus rotavirus vaccine seroconversion: a metaanalysis. *J Infect Dis* 1990; 162: 753-755
125. Pochapin M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhoea. *Amer J Gastroenterol* 2000; 95 (Suppl): S 11-S13
126. Pozo-Olano J, Warrm JH, Gomez RG. Effect of *Lactobacillus* preparation on traveler's diarrhea. *Gastroenterol* 1978; 74: 829-830
127. Provisional Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Acute Gastroenteritis. Practice parameter: The management of acute gastroenteritis in young children. *Pediatrics* 1996; 97: 424-435
128. Raboni SM, Nogueira MB, Hakim VM i in. Comparison of latex agglutination with enzyme immunoassey in detection of rotavirus in fecal specimens. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 392-394
129. Rautanen T, Isolauri E, Salo E, Vesikari T. Management of acute diarrhoea with low osmolarity oral rehydration solutions and *Lactobacillus* strain GG. *Arch Dis Child* 1998; 79: 157-160
130. Raza S, Graham SM, Allen SJ i in. *Lactobacillus* GG promotes recovery from acute nonbloody diarrhea in Pakistan. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 107-111
131. Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH i in. Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines – report of the National Multicenter Trial. *Pediatrics* 1996; 97: 7-13
132. Richards L, Claeson M., Pierce NF. Management of acute diarrhoea in children: lessons learned. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12: 5-9
133. Rogosa N, Mitchell J, Wiseman R. A selective medium for isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J.Dent Res* 1951; 30: 682-89
134. Rolfe RD: The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 2000; 130: 396S-402S
135. Ruuska T, Vesikari T. Rotavirus disease in Finnish children: use of numerical scores for clinical severity of diarrhoeal episodes. *Scand J Infec. Dis* 1990; 22: 259-267
136. Ruuska T, Vesikari T. A prospective study of acutr diarrhoea in Finnish children from birth to 2 ½ years of age. *Acta Paediatr Scand* 1991; 80: 500-507
137. Ryan MJ, Ramsay M., Brown D i in. Hospital admission attributable to rotavirus infection in England and Wales. *J Infect Dis* 1996; 174(Suppl): S12-S18
138. Saarela M., Mogensen G, Fondén R i in. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 2000; 84: 197-215
139. Saavedra JM. Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal diseases. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 21: 125-129
140. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I i in. Feeding of *Bifidobacterium*

- bifidum and *Streptococcus termophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994; 344: 1046-1049
141. Salminen S, Arvilommi H. Probiotics demonstrating efficacy in clinical settings. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 1577-1578
 142. Salminen S, Bouley C i in. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British J Nutr* 1998; 80 (Suppl): S147-S171
 143. Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 70: 347-358
 144. Sandhu BK, Isolauri E, Walker-Smith JA i in. Early feeding in childhood gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 522-527
 145. Sarker S.A., Casswall TH, Juneja LR i in. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 19-25
 146. Sarker S.A., Casswall TH, Mahalanabis D i in. Successful treatment of rotavirus diarrhoea in children with immunoglobulin from hyperimmunized bovine colostrum. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 1149-1154
 147. Savage DC, Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.* 1977; 31: 107-133
 148. Saxelin M., Chuang NH, Chassy B i in. Lactobacilli and bacteriemia in southern Finland, 1989 – 1992. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 654-566
 149. Saxelin M., Elo S, Salminen S i in. Dose-response colonization of feces after oral administration of *Lactobacillus casei* strain GG. *Microb Ecol Health Dis* 1991; 4: 209-214
 150. Scherezenmeir J, De Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 361S-364S
 151. Shornikova A-V, Casas IA, Isolauri E i in. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 399-404
 152. Shornikova A-V, Casas IA, Mykkänen H i in. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16: 1103-1107
 153. Shornikova A-V, Isolauri E, Burkanova L i in. A trial in the Karelian Republic of oral rehydration and *Lactobacillus* GG for treatment of acute diarrhea. *Acta Pediatr* 1997; 86: 460-465
 154. Show R: Viral infections of gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 53-58
 155. Show R, Merchant A, Groene W i in. Persistence of intestinal antibody response to heterologous rotavirus infection in murine model beyond 1 year. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 188-191
 156. Silva M, Jacobus NV i in. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987 31:1231-1233

157. Simakachorn N, Pichaipat V, Rithipornpaisarn P i in. Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 68-72
158. Simhon A, Douglas JR, Drasar BS, Soothill JF. Effect of feeding on infants' faecal flora. *Arch Dis Child* 1982; 52: 54-58
159. Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984; 86: 174-193
160. Smith JC, Haddrix AC, Teutsch SM, Glass RI. Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States. *Pediatrics* 1995; 96: 609-615
161. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 1998; 62: 1-9
162. Strus M., Pakosz K, Gościński H i in. Antagonistyczne działanie bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wobec beztlenowych i mikroaerofilnych czynników zakażeń przewodu pokarmowego (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Med Dośw Mikrobiol* 2001; 53: 133-142
163. Strus M., Kukła G, Heczko PB. Właściwości powierzchniowe bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. I. Właściwości hemaglutynacyjne i hydrofobowe. II. Adherencja do linii komórkowych. *Med Dośw Mikrobiol* 2001; 53: 245-251
164. Szajewska H, Albrecht P, Hoekstra H i in. Praktyka lecznicza w ostrej biegunce u dzieci w Polsce a zalecenia Europejskiego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywności Dzieci. *Ped Pol* 2000; 6: 465-473
165. Szajewska H, Kotowska M., Mrukowicz JZ. i in. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001; 138: 361-365
166. Szajewska H, Mrukowicz JZ, Albrecht P. Ostra biegunka – diagnostyka i leczenie. *Standardy Medyczne* 2000; 6: 6-14
167. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33 (Suppl): 17-25
168. Takahashi T, Nakagawa E, Nara T. Effects of orally ingested *Bifidobacterium longum* on the mucosal IgA response of mice to dietary antigens. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62: 10-15
169. Tannock GW. Medical importance of the normal microflora. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, 1999
170. Tian P, Ball JM, Zeng CQ-Y, Estes MK. Rotavirus protein expression is important for virus assembly and pathogenesis. *Arch Virol* 1996; 12 (Suppl): 69-77

171. Vanderhoof JA, Young R. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 37: 323-332
172. Velazquez FR, Matson DO, Calva JJ i in. Rotavirus infection in infants as protection against subsequent infections. *N Engl J Med.* 1996; 3: 1022-1028
173. Vesikari T. Rotavirus vaccines against diarrhoeal disease. *Lancet* 1997; 350: 1538-1541
174. Vesikari T, Rautanen T, Von Bondorff CH. Rotavirus gastroenteritis in Finland: burden of disease and epidemiological feature. *Acta Pediatr* 1999; 426(Suppl): 24-30
175. Walker-Smith JA, Sandhu BK, Isolauri E i in. Recommendations for feeding in childhood gastroenteritis. (Medical position paper guidelines prepared by the ESPGAN working group on acute diarrhoea.) *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997; 24: 619-620
176. Wunderlich PF, Braun L, Fumagalli I i in. Double-blind report of the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J Int Med. Res* 1989; 17: 333-338
177. Yolken RH, Bishop CA, Townsend TR i in. Infectious gastroenteritis in bonemarrow transplant recipients. *N Engl J Med.* 1982; 306: 1009-1012
178. Yolken RH, Leister F, Wee SB i in. Antibodies to rotavirus in chicken's eggs: a potential source of antiviral immunoglobulin suitable for human consumption. *Pediatrics* 1988; 81: 291-295
179. Yolken RH, Wyatt RG, Zissis G i in. Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N Engl J Med.* 1978; 299: 1156-1161
180. Yoshioka H, Iseki K, Fujita K. Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983, 72: 317-321
181. Zalewski T. Zakażenia jelitowe rotawirusem. W Zalewski T (red.). *Choroby przewodu pokarmowego u dzieci*, 1995, Warszawa, PZWL

