

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Gastrointestinale Mikrobiologie

**Einfluss von Synbiotika auf die intestinale Mikrobiota
gesunder Neugeborener**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin "Gastrointestinale Mikrobiologie"**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

von

Dipl. Biologin

Jana Junick

Potsdam, im September 2013

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2014/6952/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-69525>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-69525>

Ein Teil dieser Arbeit wurde in *Applied and Environmental Microbiology* veröffentlicht:

J. Junick and M. Blaut

“Quantification of human fecal *Bifidobacterium* species by quantitative real-time PCR targeting the *groEL* gene“

Appl. Environ. Microbiol. April 2012 78:2613-2622;

published ahead of print 3 February 2012 , doi:10.1128/AEM.07749-11

Für Tom und unsere Tochter Antonia

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Gestillte Kinder haben im Vergleich zu nicht gestillten Kindern eine geringere Inzidenz von gastrointestinalen Infektionen und atopischen Erkrankungen. Man geht davon aus, dass der gesundheitsfördernde Effekt der Muttermilch teilweise über die intestinale Mikrobiota vermittelt wird. Diese ist in Stillkindern durch eine geringe Diversität und einen hohen Anteil an Bifidobakterien charakterisiert. Neueste Ansätze in der Weiterentwicklung industriell hergestellter Säuglingsnahrung zielen darauf ab, eine intestinale Mikrobiota zu fördern, die der von gestillten Kindern ähnelt. Die Supplementation von Säuglingsnahrung mit Probiotika (lebende Mikroorganismen) oder Präbiotika (unverdauliche Kohlenhydrate, die als Energiesubstrat für probiotische Bakterien dienen) könnte die bifidogene und antipathogene, aber auch immunmodulierende Wirkung der Muttermilch nachahmen. Aufgrund unterschiedlicher Interaktionen mit der Darmmikrobiota und dem Immunsystem fokussiert man mit der gleichzeitigen Gabe von Pro- und Präbiotika (Synbiotika) eine synergistische Wirkung an. **Zielstellung und Studiendesign:** In einer randomisiert-kontrollierten, klinischen Studie wurde untersucht, ob sich in den ersten drei Lebensmonaten von gesunden und termingerecht geborenen Kindern mit einer Synbiotikum-haltigen Säuglingsnahrung eine intestinale Mikrobiota etabliert, die der von gestillten Kindern gleicht. Das Synbiotikum setzte sich aus *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446 (ältere Bezeichnung *B. lactis* BB-12) und Kuhmilchholigosacchariden zusammen. Die Studie umfasste zwei Gruppen von Kindern, die eine Säuglingsnahrung mit (SYN-Gruppe, $n=21$) oder ohne Supplement (KON-Gruppe, $n=18$) erhielten. Gestillte Kinder dienten als Referenz (REF-Gruppe, $n=23$). Um die Diversität der Bifidobakterien auf Speziesebene umfassend zu charakterisieren, wurden quantitative Real-Time PCR (qPCR)-Verfahren, basierend auf dem *single-copy groEL* als phylogenetisches Zielgen, zur spezifischen Quantifizierung von zwölf Bifidobakterienspezies in humanen Fäzes entwickelt und validiert. **Ergebnisse:** Die supplementierte Säuglingsnahrung war gut verträglich und unterstützte eine gesunde Entwicklung; vergleichbare anthropometrische Daten von SYN- und REF-Gruppe. Das Synbiotikum stimulierte selektiv das Wachstum von Laktobazillen und Bifidobakterien. Die Zellzahl für Laktobazillen der SYN-Gruppe war zur REF-Gruppe äquivalent ($9,07 \pm 0,32$ versus $9,90 \pm 0,27 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM [MW \pm SEM]; $p < 0,0019$; Äquivalenzdifferenz von $1 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM) und höher als in der KON-Gruppe

($8,27 \pm 0,31 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM [MW \pm SEM]). Die Zellzahl für Bifidobakterien war in der SYN-Gruppe am höchsten ($11,54 \pm 0,05$ versus $11,00 \pm 0,17$ [REF-Gruppe] und $10,54 \pm 0,24$ [KON-Gruppe] \log_{10} Zellen/g Fäzes TM [MW \pm SEM]). In der SYN-Gruppe wurde die höchste Anzahl an Bifidobakterienspezies erfasst (167 mit [128 ohne] *B. animalis* in 56 Fäzesproben versus 98 und 93 in jeweils 51 Fäzesproben der REF- und KON-Gruppe). Neben Kinder-typischen Spezies wie *B. bifidum* und *B. breve* wurden auch Spezies, die für Erwachsene charakteristisch sind (*B. adolescentis*), häufiger in der SYN-Gruppe als in den Vergleichsgruppen nachgewiesen. Der pH-Wert in Fäzes von Kindern aus der SYN-Gruppe war niedriger als der aus der KON-Gruppe ($6,07 \pm 0,20$ versus $6,45 \pm 0,17$ [MW \pm SEM]) und näher an dem von gestillten Kindern mit $5,29 \pm 0,12$ (MW \pm SEM). **Schlussfolgerung:** Die Supplementation einer Säuglingsnahrung mit dem Synbiotikum aus CNCM I-3446 und Kuhmilchhologosacchariden führte zu einer Angleichung in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota und des fäkalen pH-Wertes an gestillte Kinder. Die in dieser Arbeit entwickelten *groEL*-basierten qPCR-Verfahren erlaubten eine spezifische und genaue Analyse der Bifidobakterienpopulation unter dem Einfluss eines Synbiotikums.

ABSTRACT

Background: Compared to formula-fed infants, breast-fed infants have a reduced incidence of gastrointestinal infections and atopic diseases. The health-promoting effect of breast milk is assumed to be partly mediated by the intestinal microbiota, which is characterized by a low diversity and a high proportion of bifidobacteria. Recent approaches in further development of infant formulae aim at promoting an intestinal microbiota similar to that of breast-fed infants. The supplementation of infant formula with probiotics (live microorganisms) or prebiotics (non-digestible carbohydrates, which serves as energy substrates for probiotic bacteria) could mimic the bifidogenic and antipathogenic, but also immunomodulating effect of breast milk. Due to various interactions with the gut microbiota and the immune system, the simultaneous administration of pro- and prebiotics (synbiotics) is focussed to have a synergistic effect. **Objective and study design:** In a randomized-controlled, clinical trial healthy full-term infants receiving an infant formula with synbiotic for the first three months of life were studied, whether an intestinal microbiota is induced, which is equivalent to that of breast-fed infants. The synbiotic consisted of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446 (previously known as *B. lactis* BB-12) and cow milk oligosaccharides. The study comprised two groups of infants receiving a starter formula with (SYN-group, $n=21$) or without supplement (KON-group, $n=18$). Breast-fed infants served as a reference (REF-group, $n=23$). In order to comprehensively characterize the bifidobacteria diversity at species level, quantitative real-time PCR (qPCR) assays based on the *single-copy groEL* as phylogenetic marker for the specific quantification of twelve bifidobacteria species in human feces were established and validated. **Results:** The supplemented formula was well tolerated and supported a healthy development; comparable anthropometric data of SYN- and REF-group. The synbiotic selectively stimulated the growth of lactobacilli and bifidobacteria. Lactobacilli levels were equivalent in SYN- and REF-group (9.07 ± 0.32 versus 9.90 ± 0.27 \log_{10} cells/g feces DM [Mean \pm SEM]; $p<0.0019$; equivalence margin of 1 \log_{10} cells/g feces DM) and higher than the KON-group (8.27 ± 0.31 \log_{10} cells/g feces DM [Mean \pm SEM]). The highest levels of bifidobacteria were observed in the SYN-group (11.54 ± 0.05 versus 11.00 ± 0.17 [REF-group] and 10.54 ± 0.24 [KON-group] \log_{10} cells/g feces DM [Mean \pm SEM]). The highest number of bifidobacteria species were obtained in the SYN-group (167 with [128 without] *B. animalis* in 56 fecal samples versus 98 and 93 in each of 51 fecal samples of the REF-

and KON-group). Beside species, typically found in infants such as *B. bifidum* und *B. breve*, also species, which are characteristic for adults (*B. adolescentis*), were detected more often in the SYN-group than in the other study groups. Fecal pH was lower in the SYN- than in the KON-group 6.07 ± 0.20 versus 6.45 ± 0.17 [Mean \pm SEM]) and closer to that of breast-fed infants (5.29 ± 0.12 [Mean \pm SEM]). **Conclusion:** In infants fed a starter formula supplemented with a synbiotic (CNCM I-3446 and cow milk oligosaccharides), composition of intestinal microbiota and fecal pH were closer to that of breast-fed infants. The *groEL*-based qPCR-assays, developed in this study, allowed a specific and accurate analysis of the bifidobacterial population in response to the synbiotic intake.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die humane intestinale Mikrobiota.....	1
1.1.1	Etablierung im Neugeborenen	1
1.1.2	Funktion.....	3
1.2	Zusammensetzung der Muttermilch und Bedeutung für die Gesundheit des Neugeborenen	5
1.3	Industriell hergestellte Säuglingsnahrung – Ansätze für Weiterentwicklungen	7
1.4	Zielstellung dieser Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Studiendesign.....	12
2.1.1	Studientyp.....	12
2.1.2	Studienpopulation	12
2.1.2.1	Einschlusskriterien	13
2.1.2.2	Ausschlusskriterien	13
2.1.3	Testprodukte	13
2.1.4	Studienzentren	14
2.1.5	Studienverlauf.....	14
2.1.5.1	Gesundheitliche Überwachung	15
2.1.5.2	Fäzesprobennahme und -verarbeitung.....	16
2.2	Bakterienstämme und Kultivierungsbedingungen.....	18
2.3	Extraktion genomischer DNA aus Bakterienkulturen	19
2.4	16S rRNA-Gensequenzierung	20
2.5	Extraktion bakterieller DNA aus humanen Fäzes.....	20
2.6	Erfassung fäkaler Bakterien mittels quantitativer Real-Time PCR	22
2.6.1	Gesamtbakterien und ausgewählte Taxa.....	22
2.6.1.1	Oligonukleotid-Primer	22
2.6.1.2	Herstellung der Quantifizierungsstandards	24
2.6.2	Bifidobakterienspezies.....	26
2.6.2.1	<i>GroEL</i> -Sequenzanalyse und Ableitung speziesspezifischer Oligonukleotid-Primer ..	27
2.6.2.2	Herstellung der Quantifizierungsstandards	31
2.6.3	Quantitative Real-Time PCR-Bedingungen.....	34
2.7	Fäzesproben von Erwachsenen.....	35
2.8	Thoma-Zeiss-Zählkammer und <i>Spiking</i> -Experimente	35
2.9	Nachweis lebender Zellen des probiotischen Stammes CNCM I-3446 in Fäzes.....	36
2.10	Trockenmassebestimmung	37
2.11	Bestimmung fäkaler Immunmarker.....	38
2.11.1	Sekretorisches Immunglobulin A	38
2.11.2	α_1 -Antitrypsin	38
2.11.3	Lösliche Gesamtproteine	38
2.12	Statistik.....	38

3	ERGEBNISSE	43
3.1	Entwicklung und Validierung quantitativer Real-Time PCR-Verfahren zur Quantifizierung von Bifidobakterienspezies aus humanen Fäzes.....	43
3.1.1	Auswahl relevanter Bifidobakterienspezies.....	43
3.1.2	Spezifität der abgeleiteten Oligonukleotid-Primer	44
3.1.3	Linearitäten der Kalibriergeraden und PCR-Effizienzen	46
3.1.4	Reproduzierbarkeit	46
3.1.5	Thoma-Zeiss-Zählkammer als Referenzmethode	46
3.1.6	Bestimmungsgrenzen.....	48
3.1.7	DNA-Extraktion	48
3.1.7.1	Ausschluss von PCR-Inhibitoren	48
3.1.7.2	Reproduzierbarkeit.....	49
3.1.7.3	Anpassung der Fäzesmenge	49
3.2	Charakterisierung der Studienpopulation	51
3.3	Gesundheitliche Überwachung	52
3.3.1	Anthropometrische Entwicklung	52
3.3.2	Verträglichkeit der Testprodukte	52
3.3.3	Gesundheitszustand	53
3.4	Fäkaler pH-Wert.....	54
3.5	Profil der intestinalen Mikrobiota.....	55
3.5.1	Gesamtbakterien und ausgewählte Taxa.....	55
3.5.2	Diversität der Bifidobakterien	62
3.6	Überlebensfähigkeit des probiotischen Stammes CNCM I-3446 nach der Darmpassage	68
3.7	Fäkale Immunmarker.....	69
4	DISKUSSION	71
4.1	Hintergrund zur Etablierung <i>groEL</i> -Gen-basierter quantitativer Real-Time PCR-Verfahren für die spezifische Quantifizierung von Bifidobakterienspezies in humanen Fäzes	71
4.1.1	Vorteil des <i>single-copy groEL</i> -Gens gegenüber dem <i>multicopy</i> -16S rRNA-Gen.....	73
4.1.2	Einschränkungen mit <i>groEL</i> als molekularen Marker	74
4.2	Modulation der intestinalen Mikrobiota gesunder Neugeborener durch die Art der Ernährung.....	74
4.2.1	Bifidogene Wirkung der Säuglingsanfangsmilch mit CNCM I-3446 und Kuhmilch-oligosacchariden	75
4.2.2	Erhöhte Anzahl an Bifidobakterienspezies durch Säuglingsanfangsmilch mit CNCM I-3446 und Kuhmilcholigosacchariden	81
5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	88
	LITERATURVERZEICHNIS	89
	ANHANG	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Signifikanzniveau
AAT	α_1 -Antitrypsin
Abb.	Abbildung
ad	auf
AOS	saure Oligosaccharide (engl. <i>acidic oligosaccharides</i>)
ART	Terminologie für unerwünschte Nebenwirkungen (engl. <i>Adverse Reactions Terminology</i>)
ATCC	Amerikanische Stammkultursammlung (engl. <i>American Type Culture Collection</i>)
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMOs	Oligosaccharide aus Kuhmilch (engl. <i>bovine milk oligosaccharides</i>)
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
C_T	Schwellenwertzyklus, PCR-Zyklus, ab welchem die SYBR Green I Fluoreszenz den gewählten Schwellenwert oberhalb der berechneten Hintergrundfluoreszenz überschreitet (Bustin und Nolan 2004)
DM	Trockenmasse (engl. <i>dry matter</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ELISA	engl. <i>Enzyme-Linked-Immunosorbent-Verfahren</i>
FAO	Welternährungsorganisation (engl. <i>The Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (engl. <i>Fluorescence in situ hybridisation</i>)
FM	Feuchtmasse
FOS	Fruktooligosaccharide
g	mittlere Erdschwerebeschleunigung
GOS	Galaktooligosaccharide
H_0	Nullhypothese
H_1	Arbeitshypothese
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMOs	Oligosaccharide der humanen Milch (engl. <i>human milk oligosaccharides</i>)
IL-10	Interleukin-10
ITT-Population	Studienpopulation, die man beabsichtigte zu behandeln (engl. <i>Intention-to-Treat</i>)
IUPAC	Internationale Vereinigung allgemeiner und angewandter Chemie (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
Kap.	Kapitel
KBE	Kolonie bildende Einheit
KON-Gruppe	Kontroll-Anfangsmilchgruppe (ohne Supplementation)
M	molare Masse; Monat

Mb	Megabasen
MW	Mittelwert
<i>n</i>	Anzahl
n. b.	nicht bestimmt
Nr.	Nummer
n. s.	nicht signifikant
o. g.	oben genannt
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDX	Polydextrose
PP-Population	Studienpopulation, die nach Protokoll behandelt wurde (engl. <i>Per-Protocol</i>)
qPCR	quantitative Real-Time PCR
R^2	Korrelationskoeffizient
REF-Gruppe	Muttermilchgruppe (Referenz)
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
ssp.	Unterart (lat. <i>subspecies</i>)
sp./spp.	Spezies (lat. <i>species</i>)/Spezies (Mehrzahl)
SSW	Schwangerschaftswoche
SYN-Gruppe	Synbiotikum-Anfangsmilchgruppe (mit Supplementation)
Tab.	Tabelle
TM	Trockenmasse
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
V_K	Variationskoeffizient (relative Standardabweichung)
vs.	versus
vol/vol	Volumen/Volumen
W	Woche
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organisation</i>)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Organismen

<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>B. vulgatus</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
<i>B. adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>B. angulatum</i>	<i>Bifidobacterium angulatum</i>
<i>B. animalis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>B. breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>B. catenulatum</i>	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
<i>B. dentium</i>	<i>Bifidobacterium dentium</i>
<i>B. gallicum</i>	<i>Bifidobacterium gallicum</i>
<i>B. lactis</i>	<i>Bifidobacterium animalis subspecies lactis</i>
<i>B. longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
<i>B. pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>
<i>B. thermophilum</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>
<i>B. producta</i>	<i>Blautia producta</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. histolyticum</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>
<i>C. leptum</i>	<i>Clostridium leptum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>F. prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>R. albus</i>	<i>Ruminococcus albus</i>
<i>R. gausvreauii</i>	<i>Ruminococcus gausvreauii</i>
<i>S. aureus ssp. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus subspecies aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1	Studienverlauf	15
Abbildung 2.2	Verarbeitung der Fäzesproben für die Analyse	17
Abbildung 2.3	Schematische Lage der Oligonukleotid-Primerbindestellen im <i>groEL</i> -Gen für die Herstellung der Quantifizierungsstandards zur Quantifizierung von Bifidobakterienspezies	32
Abbildung 3.1	Vergleich der durch die entwickelten qPCR-Verfahren bestimmten <i>groEL</i> -Genkopien mit den Zellzahlen, die durch mikroskopisches Auszählen mittels Thoma-Zeiss-Zählkammer als Referenzmethode ermittelt wurden	47
Abbildung 3.2	Fäkaler pH-Wert in den Studiengruppen	54
Abbildung 3.3	Fäkale Zellkonzentrationen der Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa in den Studiengruppen	58-59
Abbildung 3.4	Fäkale Zellkonzentrationen von Bifidobakterienspezies in den Studiengruppen	64-65
Abbildung 3.5	Prävalenz lebender Zellen von CNCM I-3446 in den Fäzes der Studienteilnehmer	68
Abbildung 3.6	Konzentrationen von fäkalem Gesamt-sIgA und AAT der Kinder aus den Studiengruppen	70
Abbildung A1	Multipler Sequenzabgleich von <i>groEL</i> -Sequenzen der zu untersuchenden Bifidobakterienspezies	107-111
Abbildung A2	Lage der Oligonukleotid-Primerbindestellen im <i>groEL</i> -Gen der Referenzstämme für die Herstellung der Quantifizierungsstandards zur spezifischen Quantifizierung von Bifidobakterienspezies	112-116

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1	Verwendete Stämme	18
Tabelle 2.2	Oligonukleotid-Primer für die Quantifizierung der Gesamtbakterien und ausgewählter Taxa	23
Tabelle 2.3	Referenzstämme für die Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa	24
Tabelle 2.4	Durchschnittliche Größe und Masse der Genome von Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa	25
Tabelle 2.5	Bifidobakterien <i>groEL</i> -Sequenzen, die für die Ableitung speziesspezifischer Oligonukleotid-Primer genutzt wurden	27-29
Tabelle 2.6	Speziesspezifische Oligonukleotid-Primer für Bifidobakterien	30
Tabelle 2.7	Referenzstämme der zu untersuchenden Bifidobakterienspezies	31
Tabelle 2.8	Oligonukleotid-Primer für die Herstellung der Quantifizierungsstandards zur spezifischen Quantifizierung von Bifidobakterienspezies	33
Tabelle 2.9	Äquivalenzdifferenzen Δ für die untersuchten Bakterien	41
Tabelle 3.1	Mittels qPCR getestete Bakterienstämme zur Untersuchung der Spezifität abgeleiteter Oligonukleotid-Primer	45
Tabelle 3.2	Einfluss von geringeren Fäzesmengen in der DNA-Extraktion auf die qPCR-Ergebnisse	50
Tabelle 3.3	Charakteristika der <i>Per-Protocol</i> -Studienpopulation	51
Tabelle 3.4	Prävalenz der ausgewählten Taxa in den Fäzesproben der Neugeborenen aus den Studiengruppen	61
Tabelle 3.5	Prävalenz der Bifidobakterienspezies in den Fäzesproben der Neugeborenen aus den Studiengruppen	67
Tabelle A1	Zusammensetzung NAN 1 Protect Start	118-119
Tabelle A2	Zusammensetzung Ringerlösung	119
Tabelle A3	Zusammensetzung Extraktionspuffer	120
Tabelle A4	Zusammensetzung ST-Medium	120
Tabelle A5	Zusammensetzung 496 YCFA GSC-Medium	121-122
Tabelle A6	Zusammensetzung Tris-Acetat-EDTA-Puffer	122
Tabelle A7	Zusammensetzung Phosphat-gepufferte Salzlösung	123
Tabelle A8	Zusammensetzung Tomatensaft-Agar-Platten	123
Tabelle A9	Zusammensetzung 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung	123
Tabelle A10	Fäkale Zellkonzentrationen der Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa in den Studiengruppen (Rohdaten)	124
Tabelle A11	Fäkale Zellkonzentrationen der Bifidobakterienspezies in den Studiengruppen (Rohdaten)	125

1 EINLEITUNG

1.1 Die humane intestinale Mikrobiota

1.1.1 Etablierung im Neugeborenen

Der Fötus ist während der Entwicklung in der Gebärmutter steril. Mit der Geburt ist das Neugeborene Mikroorganismen aus der Umwelt ausgesetzt. Die Etablierung einer mikrobiellen Gemeinschaft im Darm (intestinale Mikrobiota), bei der Bakterien die ebenfalls vorhandenen Protozoen, Hefen und Bakteriophagen sowohl mengenmäßig als auch an Bedeutung übertreffen (Mackie *et al.*, 1999), stellt einen komplexen Prozess dar. Entscheidende Faktoren für die Erstbesiedlung des Darms sind die Art der Entbindung (vaginale Geburt/Kaiserschnittgeburt), die Zusammensetzung der maternalen Mikrobiota (Haut, Mund, Vagina, Fäzes) und die Ernährung des Neugeborenen (Muttermilch, industriell hergestellte Säuglingsnahrung) (Biasucci *et al.*, 2008; Grönlund *et al.*, 1999; Mackie *et al.*, 1999; Penders *et al.*, 2006). Mikrobielle und Bakterien-Wirt-Interaktionen haben ebenfalls einen Einfluss auf die Besiedlung (Fanaro *et al.*, 2003; Rolfe 1984). Innerhalb der ersten Lebensstage wird der Darm durch Enterobacteriaceae und grampositive Kokken (Laktobazillen, Enterokokken, Streptokokken, Staphylokokken) besiedelt (Mackie *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2005; Sakata *et al.*, 1985). Man geht davon aus, dass diese fakultativ anaeroben und aerotoleranten Bakterien vorhandenen Sauerstoff verbrauchen und damit eine reduzierte Umgebung für die nach etwa einer Woche dominierenden strikt anaeroben Bifidobakterien, Bacteroides und Clostridien schaffen (Mackie *et al.*, 1999). Die intestinale Mikrobiota eines Kindes unterliegt aufgrund der morphologischen, funktionellen und immunologischen Reifeprozesse des Darms relativ großen Änderungen. Vor allem die Einführung von Beikost und das spätere Abstillen führen zu drastischen Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung (Stark und Lee 1982). Mit etwa zwei Jahren hat sich eine auch für einen erwachsenen Menschen typische intestinale Mikrobiota herausgebildet, die bis ins Alter weitgehend stabil bleibt (Hopkins *et al.*, 2001; Mackie *et al.*, 1999; Mitsuoka 1992; Zoetendal *et al.*, 1998). Obwohl sich das Stoffwechsellpotenzial der Mikrobiota im Darm aller Menschen weitgehend zu gleichen scheint (Turnbaugh *et al.*, 2009), bestehen große inter-individuelle Unterschiede in der Zusammensetzung der

Bakteriengemeinschaft (Zoetendal *et al.*, 1998). Die mikrobielle Besiedlung nimmt an Diversität und Zellzahlen entlang des Darms zu und kann bis zu 10^{12} Bakterien/g Koloninhalt erreichen (Kleessen *et al.*, 2000). Man schätzt, dass der Darm eines Erwachsenen von mehr als 400 Bakterienspezies besiedelt wird (Moore und Holdeman 1974). Jedoch werden 99% der kultivierbaren fäkalen Bakterien von nur 30 bis 40 dominanten Spezies repräsentiert (Hooper *et al.*, 2002). Die meisten Vertreter werden dem Phylum Firmicutes, dem Gattungen wie *Clostridium*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* und *Streptococcus* angehören, sowie dem Phylum Bacteroidetes mit den Gattungen *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella* und *Porphyromonas* zugeordnet. Weitere Phyla im humanen Darm sind Actinobacteria (mit Gattungen wie *Bifidobacterium*, *Eggerthella*, *Coriobacterium*, *Collinsella* und *Slackia*), Proteobacteria (mit der Gattung *Escherichia*), Fusobacteria und Verrucomicrobia (Bäckhed *et al.*, 2005; Eckburg *et al.*, 2005).

Muttermilch enthält eine Vielzahl an Inhaltsstoffen, die besonders das Wachstum von Bifidobakterien stimulieren (Sela und Mills 2010). Diese sogenannten bifidogenen Faktoren führen bei gestillten Säuglingen meist zu einer einfach zusammengesetzten intestinalen Mikrobiota, bei der Bifidobakterien deutlich überwiegen (60-91% in Fäzes; Harmsen *et al.*, 2000; Nakayama 2010). Dominante Spezies sind: *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* (*Bifidobacterium longum* ssp. *infantis*) und *Bifidobacterium bifidum* (Gore *et al.*, 2008; Haarman und Knol 2005; He *et al.*, 2001a; Mackie *et al.*, 1999; Nakayama 2010; Rinne *et al.*, 2005). Neugeborene, die ausschließlich mit industriell hergestellter Säuglingsnahrung ernährt werden, besitzen eine komplexere Mikrobiota, in der Bifidobakterien mit 28-75% in Fäzes (Harmsen *et al.*, 2000) ebenfalls dominant sein können. Die Bifidobakteriendiversität dieser Kinder ähnelt der von Erwachsenen; *Bifidobacterium adolescentis* und die *Bifidobacterium catenulatum*-Gruppe sind stärker vertreten als andere Bifidobakterienspezies (Haarman und Knol 2005; Kleessen *et al.*, 1995). *Bacteroides*, Clostridien (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*) und *Escherichia coli* wurden in höheren Konzentrationen als in gestillten Kindern nachgewiesen (Benno *et al.*, 1984; Harmsen *et al.*, 2000; Kleessen *et al.*, 1995; Langhendries *et al.*, 1995; Penders *et al.*, 2006; Penders *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 1992; Scholtens *et al.*, 2008). Neugeborene, die mittels Kaiserschnitt geboren werden, zeigen, im

Vergleich zu vaginal entbundenen Kindern, eine verzögerte Besiedlung des Darms, wobei Bifidobakterien relativ niedrigere und *C. difficile* relativ höhere Zellzahlen aufweisen (Biasucci *et al.*, 2008; Grönlund *et al.*, 1999; Penders *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass neben genetischen Faktoren (Turnbaugh *et al.*, 2009; Zoetendal *et al.*, 2001; Zoetendal *et al.*, 1998) und Umwelteinflüssen (Goldenberg *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2001) der Verlauf der Besiedlungsphase für die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota im Erwachsenenalter von großer Relevanz ist (Edwards und Parrett 2002; Favier *et al.*, 2003; Favier *et al.*, 2002; Stark und Lee 1982).

1.1.2 Funktionen

Die humane intestinale Mikrobiota trägt entscheidend zur Aufrechterhaltung der Darmbarriere bei. Bereits die Anwesenheit der kommensalen mikrobiellen Gemeinschaft verhindert das Wachstum von pathogenen Bakterien (Kolonisationsresistenz). Neben verfügbaren Substraten besteht auch eine Konkurrenz um Anheftungsstellen in der Mukusschicht, die das Darmepithel bedeckt (Hansson und Johansson 2010). Der dichte Besatz der Mukusoberfläche mit kommensalen Bakterien erschwert die Translokation von Darmerregern wie enteropathogene *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Salmonella typhimurium*-Stämmen (Bernet *et al.*, 1993). Ein weiterer Schutz vor Pathogenen sind antimikrobiell wirkende Substanzen wie kurzkettige Fettsäuren, Laktat, Bakteriozine und Wasserstoffperoxid, die von Milchsäurebakterien (z. B. Laktobazillen) und Bifidobakterien gebildet werden (Cheikhoussef *et al.*, 2008; Cleusix *et al.*, 2007; Gibson und Wang 1994; Liévin *et al.*, 2000; Suskovic *et al.*, 2010).

Darmbakterien haben einen erheblichen Einfluss auf das darmassoziierte lymphatische Gewebe, den größten Teil des humanen Immunsystems. Dabei wird sowohl die Ausdifferenzierung beim Neugeborenen als auch das lebenslange Training des Abwehrsystems ermöglicht. So wurde z. B. gezeigt, dass kommensale Bakterien der intestinalen Mikrobiota wie Bifidobakterien fähig sind, die Bildung spezifischer sekretorischer Immunglobuline A (sIgA) zu verstärken (Brandtzaeg 2002; Park *et al.*, 2002; Yasui *et al.*, 1992).

Die Dickdarmmikrobiota nutzt zur Energiekonservierung hauptsächlich die Fermentation von Kohlenhydraten, die im oberen Verdauungstrakt des Wirts nicht hydrolysiert wurden. Diese schließen unverdauliche Kohlenhydrate wie Hemicellulose, Pektin, Inulin, aber auch resistente Stärke, ein. Dabei werden neben Gasen (H_2 , CO_2 , CH_4) v. a. kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat) gebildet, die zu etwa 95% vom Wirt zur weiteren Energieversorgung resorbiert werden (Cummings und Macfarlane 1991). Butyrat stellt den wichtigsten trophischen Faktor für die Darmepithelzellen dar (Cummings und Macfarlane 1991). Sein Einfluss auf die Darmreifung im Neugeborenen scheint jedoch eher unbedeutend (Mountzouris *et al.*, 2002). Die Bildung von kurzkettigen Fettsäuren erniedrigt den pH-Wert im Darm und trägt damit zum Schutz vor pathogenen Mikroorganismen bei. Dagegen entstehen bei der Metabolisierung von Proteinen durch *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. oder andere proteolytische Bakterien Amine, Ammoniak, Sulfid und Phenol (Mountzouris *et al.*, 2002), die zu einer Alkalisierung des Darminhalts führen. Darüber hinaus katalysiert die intestinale Mikrobiota eine Vielzahl anderer Reaktionen. So können die beiden wichtigsten Gallensäuren Cholsäure und Chenodesoxysäure zu den sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure bzw. Lithocholsäure mikrobiell transformiert werden. Diese stellen Tumorpromotoren bei der Entstehung von Dickdarmkrebs dar (Ogawa *et al.*, 1998; Summerton *et al.*, 1985). Durch eine bakterielle Aktivierung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe Lignane und Isoflavone entstehen Verbindungen, die eine protektive Wirkung bei Brust- und Prostatakrebs, Herz-Kreislaufkrankungen und menopausalen Problemen zeigen (Matthies *et al.*, 2009; Raffaelli *et al.*, 2002). Weiterhin ist die Darmmikrobiota in der Lage, eine Vielzahl an Vitaminen zu synthetisieren (z. B. Cobalamin, Folat, Riboflavin, Thiamin, K_2), wobei sie den Menschen vermutlich nur im Falle von Vitamin K_2 partiell versorgt (Rolfe 1984; Schulze *et al.*, 2008).

Eine Störung des natürlichen Gleichgewichts in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota steht mit einer Vielzahl an Krankheiten in Verbindung. So kann es, als unerwünschte Nebenwirkung einer Antibiotika-Therapie, zu einer Verschiebung zugunsten von Enteropathogenen wie *Staphylococcus aureus*, *Candida* spp. oder *C. difficile* mit einhergehender Diarrhö kommen. Die Antibiotika-assoziierte Diarrhö ist bei Kindern häufiger als bei Erwachsenen (Johnston und Vohra 2009). Bei chronisch entzündlichen

Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zeigt sich eine abnorme mikrobielle Zusammensetzung mit veränderter metabolischer Aktivität (Sartor 2008).

1.2 Zusammensetzung der Muttermilch und Bedeutung für die Gesundheit des Neugeborenen

Von den in der Muttermilch enthaltenen Kohlenhydraten weist das Disaccharid Laktose die höchste Konzentration auf. Im Dünndarm des Säuglings wird Laktose sehr schnell durch das Verdauungsenzym β -Galaktosidase hydrolysiert. Die Monosaccharide Glukose und Galaktose können dann resorbiert werden. Ein geringer Teil der Laktose gelangt jedoch ungespalten in den Dickdarm (Schulze und Zunft 1991), wo es mikrobiell, v. a. durch Milchsäurebakterien und Bifidobakterien, fermentiert wird. Eine weitere Kohlenhydratquelle in der Muttermilch sind lösliche Oligosaccharide, die in einer strukturell sehr komplexen Mischung aus D-Glukose, D-Galaktose, L-Fukose, *N*-Acetylglukosamin und *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) zusammengesetzt sind. Am reduzierenden Ende dieser Verbindungen befindet sich Laktose. Die Oligosaccharide der humanen Milch (HMOs, engl. *human milk oligosaccharides*) sind weitgehend unverdaulich und stehen der Mikrobiota im Dickdarm als Substrate zur Verfügung (Chaturvedi *et al.*, 2001). Sie stimulieren vorwiegend das Wachstum von Bifidobakterien, die typisch für die Mikrobiota von Neugeborenen sind wie z. B. *B. longum* ssp. *infantis* (German *et al.*, 2008; LoCascio *et al.*, 2007; Marcobal *et al.*, 2010; Sela und Mills 2010; Ward *et al.*, 2007). Je nach Vorhandensein spezifischer Glykosidasen bestehen stammspezifische Präferenzen für bestimmte HMOs (LoCascio *et al.*, 2007; LoCascio *et al.*, 2009; Sela und Mills 2010). Aufgrund ihrer Struktur können HMOs auch als lösliche Rezeptoranaloga für Pathogene und Toxine fungieren (El-Hawiet *et al.*, 2011; Kunz *et al.*, 2000; Sela und Mills 2010). Dadurch kann die Adhäsion an die Darmmukosa als häufige Voraussetzung für die Pathogenese von Bakterien verhindert werden.

Um die noch unreife Niere des Säuglings nicht zu belasten, weist die Muttermilch einen niedrigen Proteinanteil auf, der sich hauptsächlich aus Molkenprotein und Kasein zusammensetzt (Lönnerdal 2003). Es wird häufig ein durchschnittliches Molkenprotein/Kasein-Verhältnis von 60/40 angegeben, wobei sich dieses von zunächst etwa 80/20 in der frühen Phase bis etwa 50/50 zum Ende der Laktation verschiebt

(Lönnerdal 2003). Die in der Muttermilch enthaltenen Proteine dienen nicht nur zur Versorgung des Neugeborenen mit essentiellen Aminosäuren. Sie umfassen auch zahlreiche antibakteriell wirkende Proteine, die relativ stabil gegenüber proteolytischem Abbau sind (Lönnerdal 2003). So besitzt Laktoferrin eine hohe Bindeaffinität zu Eisen, das für Mikroorganismen oft ein limitierender Wachstumsfaktor ist. Während Laktobazillen in einem komplexen Medium nicht auf Eisen angewiesen sind (Archibald 1983; Elli *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 1994), scheinen Bifidobakterien sogar über Laktoferrin mit Eisen versorgt und damit in ihrem Wachstum stimuliert zu werden (Miller-Catchpole *et al.*, 1997; Petschow *et al.*, 1999). Dies wird wahrscheinlich über spezifische Laktoferrin-bindende Proteine vermittelt (Kim *et al.*, 2002). *B. bifidum* und *B. breve* weisen eine deutlich höhere Affinität zu Laktoferrin auf als *E. coli* (Petschow *et al.*, 1999). Frei verfügbares Eisen wird damit v. a. Pathogenen vorenthalten (Schaible und Kaufmann 2004). Als Protease kann Laktoferrin die Translokation des Atemwegserregers *Haemophilus influenzae* sowie der Virulenzproteine von *Shigella* und enteropathogener *E. coli* verhindern (Hendrixson *et al.*, 2003; Ochoa und Clearly 2004). Die mit der Muttermilch übertragene Laktoperoxidase katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Thiocyanat (im Speichel vorhanden) zu Hypothiocyanat, das ein breites Spektrum antimikrobieller Aktivität aufweist (Björck *et al.*, 1975; Lenander-Lumikari 1992; Mikola *et al.*, 1995; Steele und Morrison 1969). Weiterhin kann Lysozym aus der Muttermilch die β -1,4-glykosidische Bindung zwischen *N*-Acetylmuraminsäure und *N*-Acetylglukosamin des Peptidoglykans der Zellwand grampositiver Bakterien hydrolysieren (Chipman und Sharon 1969). Mit der Muttermilch werden aber auch immunstimulierende Proteine übertragen, wodurch die Entwicklung und Reifung des kindlichen Immunsystems gefördert wird. SIgA stellt mit über 90% den häufigsten und bedeutsamsten der übertragenen Immunglobuline dar (Lönnerdal 2003). Durch eine spezifische Bindung an Toxine bzw. an die Oberfläche von Mikroorganismen werden diese neutralisiert (Antigen-Ausschluss), wodurch eine Translokation verhindert werden kann (Strokes *et al.*, 1975). Vom Darm bzw. den Bronchien gelangen die IgA produzierenden B-Lymphozyten in die Milchdrüsen der Mutter (Goldman 1993). Die erworbene mukosale Immunität der Mutter gegen verbreitete Mikroorganismen kann somit passiv auf das Kind übertragen werden. So konnten in der Muttermilch spezifische sIgA gegen verschiedene Darm- und Atemwegserreger (z. B. *E. coli*, *Salmonella*, *C. difficile*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*), Viren

(z. B. Rotavirus, Influenza Virus, HIV) und Pilze (z. B. *Candida albicans*) nachgewiesen werden (Goldman 1993). Muttermilch enthält auch eine Vielzahl an Zytokinen, wobei die meisten davon antiinflammatorisch wirken (z. B. IL-10) (Lönnerdal 2003). Weiterhin weist Muttermilch eine hohe Anzahl an Immunzellen wie phagozytierende Makrophagen auf. Es ist gezeigt worden, dass Makrophagen sIgA enthalten, das bei Kontakt mit Bakterien im Darm freigesetzt werden könnte (Slade und Schwartz 1987).

Muttermilch gilt weltweit als die optimale Nahrung für Säuglinge. Sie enthält alle lebensnotwendigen Nährstoffe für eine gesunde Entwicklung des Neugeborenen und passt sich zudem an die Bedürfnisse des Kindes an. So verändert sich die Zusammensetzung der Muttermilch während der Stillmahlzeit, in Abhängigkeit von der Laktationsdauer und bei Erkrankung der Mutter. Daher empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation (WHO, engl. *World Health Organisation*), Kinder bis zu einem Alter von sechs Monaten ausschließlich zu stillen. Anschließend soll das Stillen zusammen mit geeigneter Beikost bis zu zwei Jahren oder darüber hinaus fortgesetzt werden.

1.3 Industriell hergestellte Säuglingsnahrung – Ansätze für Weiterentwicklungen

Für Mütter, die sich aus unterschiedlichen Gründen gegen das Stillen ihres Kindes entscheiden, wird bereits seit dem frühen 19. Jahrhundert versucht, alternative Produkte zur Muttermilch zu entwickeln. Als Grundlage für industriell hergestellte Säuglingsnahrung dient häufig Kuhmilch, die sich jedoch in ihrer Zusammensetzung von humaner Milch stark unterscheidet, v. a. in Bezug auf die Konzentration und Struktur von Proteinen und Kohlenhydraten wie z. B. Laktoferrin und HMOs (BZgA 2001; Davidson und Lönnerdal 1988). Moderne Säuglingsnahrung zielt darauf ab, die positiven Effekte von humaner Milch so weit wie möglich zu erreichen. Eine Möglichkeit besteht in der Anpassung der Makro- und Mikronährstoffe an die der Muttermilch, so dass ein für Laktobazillen und Bifidobakterien günstiges Milieu geschaffen wird (z. B. Zugabe von humanem Laktoferrin, niedriger Gehalt an Protein und Phosphor). Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Etablierung einer intestinalen Mikrobiota zu fördern, deren Diversität und Aktivität der von gestillten Kindern ähnelt. Dafür könnte die Supplementation von Pro- und/oder Präbiotika einen potenziellen Ansatz darstellen.

Probiotika sind lebende Mikroorganismen, die nach Verabreichung in adäquaten Mengen von gesundheitlichem Nutzen für den Wirt sind (FAO/WHO 2002). Die am häufigsten eingesetzten Organismen gehören den Gattungen *Lactobacillus* (z. B. *Lactobacillus rhamnosus* GG) und *Bifidobacterium* (z.B. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446, ältere Bezeichnung *B. lactis* BB-12) an. Von Probiotika geht eine antimikrobielle Wirkung aus. Dies wird hauptsächlich durch die Bildung von Bakteriozinen und kurzkettiger Fettsäuren, die eine Senkung des intestinalen pH-Werts bewirken, erreicht. Ein weiterer probiotischer Effekt besteht in der vorteilhaften Modulation des intestinalen Immunsystems (z. B. Stimulation der Phagozytoseaktivität, Bildung von sIgA). Die Wirksamkeit eines Probiotikums ist jedoch stark dosisabhängig und stammspezifisch (Braegger *et al.*, 2011).

Präbiotika sind selektiv fermentierbare Nahrungsbestandteile, die spezifische Veränderungen in der Zusammensetzung und/oder Aktivität der intestinalen Mikrobiota ermöglichen und damit zum Wohlbefinden und zur Gesundheit des Wirts beitragen (Roberfroid *et al.*, 2010). Präbiotika stimulieren das Wachstum von Laktobazillen und Bifidobakterien, indem sie als entsprechende Energiesubstrate fungieren (Roberfroid *et al.*, 2010). Die in der Muttermilch enthaltene Laktose sowie die etwa 130 verschieden aufgebauten Oligosaccharide haben präbiotische Wirkungen im Dickdarm (German *et al.*, 2008). Erst seit wenigen Jahren ist es durch technischen Fortschritt möglich, die starke Heterogenität der HMOs zu analysieren (Zivkovic und Barile 2011). Bislang wurden häufig relativ einfach aufgebaute kommerziell hergestellte Oligosaccharide wie enzymatisch synthetisierte Galaktooligosaccharide (GOS) und aus Pflanzen gewonnene Fruktooligosaccharide (FOS) bzw. Oligosaccharidmischungen (z. B. GOS/FOS; Verhältnis 9:1) als Präbiotika eingesetzt. Die linear aneinandergereihten Monomere bestehen nur aus bis zu zwei Monosacchariden. Dagegen führen diverse Kombinationen aus fünf Monosacchariden, die durch eine Vielzahl an α - und β -glykosidischen Bindungen verknüpft sind, zu einer reich verzweigten Struktur der HMOs. Biologische Funktionen von Oligosacchariden (z. B. Substrate für Bifidobakterien, Rezeptoranaloga für Mikroorganismen) sind stark strukturabhängig. Um Säuglingsnahrung möglichst eng an Muttermilch anzupassen, sollten Oligosaccharide verwendet werden, die den HMOs strukturell und damit auch funktionell ähnlich sind (Kunz *et al.*, 2000; Zivkovic und Barile

2011). Dies könnte durch die Verwendung von natürlich vorkommenden Oligosacchariden aus Kuhmilch (BMOs, engl. *bovine milk oligosaccharides*) umgesetzt werden (Gopal und Gill 2000). Obwohl BMOs hinsichtlich Monosaccharide, glykosidischer Bindungen und Aufbau weniger Komplexität als HMOs aufweisen, haben sie wichtige strukturelle Gemeinsamkeiten. So sind BMOs ebenfalls verzweigt und haben gemeinsame Strukturelemente wie Sialyl- und Galaktosyllaktosen (Aldredge *et al.*, 2013; Barile *et al.*, 2009; Chichlowski *et al.*, 2011; Gopal und Gill 2000; Kunz *et al.*, 2000; Zivkovic und Barile 2011). Daher könnte das Gemisch von Oligosacchariden aus Kuhmilch, v. a. aus dem Kolostrum, als bioaktive Komponente in Säuglingsnahrung die modulierende Wirkung der Muttermilch auf die intestinale Mikrobiota vermitteln (Gopal und Gill 2000; Zivkovic und Barile 2011).

Eine Kombination aus Pro- und Präbiotikum wird als Synbiotikum bezeichnet. Hierbei soll die Überlebensfähigkeit des zugegebenen probiotischen Stammes durch die Bereitstellung eines spezifischen Substrats (Präbiotikum) gewährleistet werden (O'Sullivan 2001; Schrezenmeir und de Vrese 2001). Aufgrund der unterschiedlichen Interaktionen mit der Darmmikrobiota und dem Immunsystem zielt man mit der gleichzeitigen Gabe von Pro- und Präbiotika auf eine synergistische Wirkung ab.

Es gibt bisher nur wenige randomisiert-kontrollierte Humanstudien, die die Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit von Säuglingsnahrung mit Synbiotika an gesunden und termingerecht geborenen Kindern bereits in den ersten Lebensmonaten untersucht haben. Da die resultierenden Daten aus konzeptionell gut angelegten klinischen Studien noch unzureichend sind, wird der routinemäßige Einsatz von Synbiotika in Säuglingsnahrung durch die Europäische Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung (ESPGHAN) aktuell nicht empfohlen (Braegger *et al.*, 2011). Dennoch stellt seit wenigen Jahren die Supplementation mit Pro- und Präbiotika einen wichtigen Ansatz in der Weiterentwicklung eines adäquaten Ersatzes für die Muttermilch dar.

1.4 Zielstellung dieser Arbeit

Der Gastrointestinaltrakt ist zunächst steril und wird rasch besiedelt, sobald das Neugeborene mit der Umwelt in Kontakt kommt. Verglichen zu nicht gestillten Kindern leiden gestillte Kinder seltener an gastrointestinalen Infektionen und atopischen Erkrankungen (Howie *et al.*, 1990; Newburg 2005; van Odijk *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass dieser gesundheitsfördernde Effekt der Muttermilch teilweise über die intestinale Mikrobiota vermittelt wird. Diese wird in gestillten Kindern durch Bifidobakterien und Milchsäurebakterien dominiert, während potenziell Pathogene inhibiert werden. Muttermilch stellt die optimale Nahrung für Neugeborene dar. Mütter, die sich nicht für Stillen entscheiden oder nicht in der Lage sind, zu stillen, benötigen eine alternative Säuglingsnahrung. Ein neuer Ansatz in der Weiterentwicklung von industriell hergestellter Säuglingsnahrung besteht in der Supplementation mit Probiotika und/oder Präbiotika. Dadurch könnte die bifidogene, antipathogene und immunmodulierende Wirkung der Muttermilch auch in nicht gestillten Kindern zum Teil vermittelt werden.

Ziel der vorgestellten, klinischen Studie war es, zu untersuchen, ob in gesunden Neugeborenen, die eine Säuglingsmilch mit Synbiotika erhalten, eine intestinale Mikrobiota aufgebaut wird, die weitgehend der von gestillten Kindern gleicht und ob, wie bei Letzteren, die Barrierefunktion im Darm gestärkt wird. In einem nicht-invasiven Verfahren wurden Fäzesproben der Neugeborenen analysiert. Das verwendete Synbiotikum setzte sich aus *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446 (ältere Bezeichnung *B. lactis* BB-12) und Kuhmilcholigosacchariden zusammen. Der hier eingesetzte probiotische Stamm wurde bereits in zahlreichen Studien zur Therapie und Prävention von akutem sowie Antibiotika-assoziiertem Durchfall, nekrotisierender Enterokolitis und atopischen Erkrankungen in Säuglingen und Kindern erfolgreich angewendet (Saavedra 2007). Aufgrund seiner langjährigen und sicheren Anwendung wurde CNCM I-3446 von der *U.S. Food and Drug Administration* als allgemein sicher (GRAS-Status, „*generally recognized as safe*“) eingestuft. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft wurde unter Anwendung etablierter PCR-Nachweismethoden für ausgewählte darmrelevante Bakteriengruppen quantitativ erfasst. Da Bifidobakterien in gestillten Kindern dominieren und ihnen eine bedeutende, gesundheitsfördernde Rolle zugesprochen wird, sollte die Diversität dieser Gattung auf Speziesebene umfassend charakterisiert

werden. Das für die bakterielle Identifizierung häufig genutzte 16S rRNA kodierende Gen (Fox *et al.*, 1980) stellt jedoch für Bifidobakterienspezies mit relativ hohen Sequenzidentitäten von etwa 95% (Miyake *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2006) keinen geeigneten molekularen Marker dar. Daher wurden quantitative Real-Time PCR (qPCR)-Verfahren auf der Basis von *groEL* als alternatives phylogenetisches Zielgen zur spezifischen Quantifizierung von zwölf *Bifidobacterium* Spezies in humanen Fäzesproben entwickelt und validiert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign

2.1.1 Studientyp

Eine exploratorische, doppelblinde, randomisiert-kontrollierte und multizentrische, klinische Studie wurde mit gesunden und termingerecht geborenen Kindern durch Nestec Ltd, Nestlé Nutrition (Vevey, Schweiz) konzipiert und geleitet. Die Studie umfasste zwei Gruppen von Kindern, die eine Anfangsmilch mit (Interventionsgruppe; SYN-Gruppe) oder ohne Synbiotikum-Supplement (Kontrollgruppe; KON-Gruppe) erhielten. Eine zusätzliche Gruppe gestillter Kinder diente als Referenzgruppe (REF-Gruppe). Die Probennahme erfolgte bei allen Gruppen parallel. Das Studienprotokoll wurde durch eine unabhängige Ethik-Kommission geprüft und genehmigt. Die Studie wurde nach den ethischen Grundsätzen der Deklaration von Helsinki einschließlich ihrer Ergänzungen und den internationalen Richtlinien der *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* für „Gute Klinische Praxis“ sowie der Einhaltung geltender rechtlicher Anforderungen durchgeführt.

2.1.2 Studienpopulation

Vor Beginn der Studie wurde die notwendige Gruppengröße durch eine Poweranalyse (Power von 80%) unter Einbeziehung zuvor durchgeführter, ähnlicher Studien berechnet. Die Analyse ergab, dass eine Gruppengröße von mindestens 30 Kindern erforderlich ist, um eine signifikante Aussage über eine mögliche Änderung der Hauptparameter dieser Studie treffen zu können. Für die Rekrutierung wurden schließlich 38 Kinder pro Gruppe angestrebt (insgesamt $n = 114$), wobei ein Ausfallanteil von 20% angenommen wurde. Die Randomisierung der Kinder auf die Anfangsmilchgruppen erfolgte nach ihrem Geschlecht und der Art der Entbindung (vaginale Geburt, Kaiserschnittgeburt) mithilfe der Software TrialSYS (Red Wharf Systems Ltd, Pentraeth, UK).

2.1.2.1 Einschlusskriterien

An der Studie nahmen gesunde, termingerecht geborene Kinder (37.-42. Schwangerschaftswoche), unabhängig von ihrer Herkunft und mit einem Geburtsgewicht von ≥ 2500 g und ≤ 4500 g teil. Weiterhin waren folgende Kriterien erfüllt:

(i) Anfangsmilchgruppen:

Kinder, deren Mütter sich entschieden haben, nach dem 14. Lebenstag ihres Kindes nicht weiter zu stillen.

(ii) Muttermilchgruppe:

Kinder, deren Mütter sich entschieden haben, ihr Kind von Geburt an bis zum Alter von mindestens drei Monaten ausschließlich zu stillen.

Bei Teilnahme an der Studie lag die schriftliche Einwilligungserklärung der gesetzlichen Vertreter der Neugeborenen vor.

2.1.2.2 Ausschlusskriterien

Kinder, die mindestens eine der folgenden Kriterien erfüllten, wurden nicht für die Studie rekrutiert: angeborene Erkrankung oder Missbildung, bedeutende prä- und/oder postnatale Erkrankungen, Klinikaufenthalt für > 2 Tage innerhalb der ersten 14 Lebenstage (außer bei Gelbsucht), Antibiotika-Einnahme innerhalb der ersten 14 Lebenstage, Einnahme von Säuglingsnahrung mit Pro- und/oder Präbiotika zum Zeitpunkt der Aufnahme in diese Studie, geringes kooperatives Verhalten des gesetzlichen Vertreters, gleichzeitige Teilnahme an einer anderen Studie.

2.1.3 Testprodukte

Die Testprodukte wurden vom *Nestlé Product Technology Center* (Konolfingen, Schweiz) nach den internationalen Richtlinien „Guter Herstellungspraxis“ in Pulverform hergestellt. Es handelte sich um eine Säuglingsnahrung zum Zufüttern oder für die vollständige Ernährung von Kindern bis zu einem Alter von vier Monaten (Säuglingsanfangsmilch) mit niedrigem Protein- und Phosphorgehalt (Nestlé Nan 1 Protect Start: 9,2 g Protein, 220 mg Phosphor, 2064 kJ (493 kcal) – Angaben je 100 g; Molkenprotein/Kasein Verhältnis 70/30, **Anhang Tab. A1**). Während die Kontroll-Anfangsmilch unverändert blieb, wurde die

experimentelle Anfangsmilch mit Oligosacchariden aus Kuhmilch ($5,7 \pm 0,2$ g/100 g) und *B. animalis* ssp. *lactis* CNCM-I-3446 in einer Konzentration von 1×10^9 KBE je 100 g supplementiert. Die Testprodukte wurden mit der Studiennummer und den Buchstaben A (Kontroll-Anfangsmilch) oder B (experimentelle Anfangsmilch) verblindet. Eine Anleitung für die Zubereitung und Dosierung der Testprodukte war am Produkt vorhanden.

2.1.4 Studienzentren

Die Rekrutierung der Kinder sowie die vorgesehenen Untersuchungen zur Erhebung der Messparameter erfolgten in vier Krankenhäusern:

The Medical University of Warsaw, The Second Department of Paediatrics,
Dzialdowska 1, 01-184 Warschau/Polen

Hôpital Saint Joseph, 26 Boulevard de Louvain, 13008 Marseille/Frankreich

Hôpital de la Conception, Maternité, 147 Boulevard Baille, 13005 Marseille/Frankreich

Hôpital Nord, Chemin de bourellys, 13015 Marseille/Frankreich

Aufgrund des hohen Stillanteils in der Warschauer Kinderklinik ging die Rekrutierung der Kinder nur sehr langsam voran. Daher wurde die klinische Studie in Warschau abgebrochen und in Marseille fortgesetzt. Die Auswertung der Studie basiert ausschließlich auf den Daten der Kinder, die in den drei Krankenhäusern in Marseille rekrutiert worden waren.

2.1.5 Studienverlauf

Die Rekrutierung der Kinder erfolgte zwischen Oktober 2009 und April 2011, wobei die Intervention 3 Monate dauerte. Die gesundheitliche Überwachung der Studienteilnehmer und die Fäzesprobennahmen wurden während der vorgesehenen Untersuchungen in den Studienzentren (0-14 Tage, 6 Wochen [± 3 Tage] und 3 Monate [± 3 Tage] nach Geburt des Kindes) durchgeführt (**Abb. 2.1**). Nach Analyse der Fäzesproben wurde die Studie zur statistischen Auswertung der erhaltenen Daten entblindet.

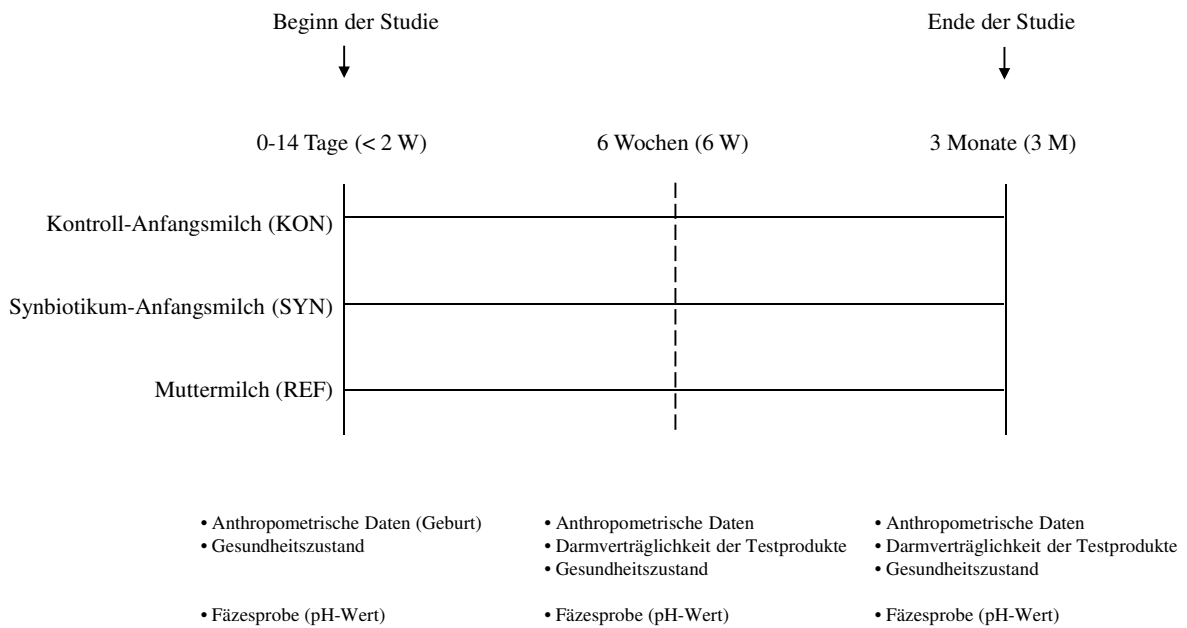


Abbildung 2.1. Studienverlauf

2.1.5.1 Gesundheitliche Überwachung

Anthropometrische Daten (Körpergewicht, Körpergröße und Kopfumfang) wurden zum Zeitpunkt der Geburt, 6 W (± 3 Tage) und 3 M (± 3 Tage) nach der Geburt erhoben. Die Verträglichkeit der Testprodukte bzw. der Muttermilch wurde mittels eines Fragebogens durch die gesetzlichen Vertreter für je 3 Tage vor einer Untersuchung im Studienzentrum protokolliert. Dafür wurden folgende Parameter charakterisiert: Fäzes (Häufigkeit der Defäkation, Farbe, Konsistenz, Geruch), Blähungen, Darmkolik, Regurgitation (flüssiges Aufstoßen/Speien), Erbrechen und Verhalten (unruhig, schreien). Der Gesundheitszustand des Kindes wurde bei jedem Besuch im Studienzentrum dokumentiert. Das Auftreten sowie die Schwere von Erkrankungen, vor allem Infektionen in den Atemwegen und im Gastrointestinaltrakt, wurden als (schwerwiegende) unerwünschte Ereignisse umfassend aufgenommen.

2.1.5.2 Fäzesprobennahme und -verarbeitung

In der Regel wurde eine Fäzesprobe während der Untersuchung im Studienzentrum gesammelt. War dies nicht möglich, wurde die Fäzesprobe zu Hause durch die Eltern genommen. Dabei wurden sie angehalten, 5 g (entspricht einem Teelöffel) frischen Fäzes innerhalb von 30 min nach Defäkation in einen sterilen Behälter zu überführen. Dieser Behälter sollte zusammen mit einem Beutel AnaeroGen (Oxoid, Cambridge, UK) zur Herstellung einer anaeroben Atmosphäre aus Stickstoff und Kohlendioxid in einer fest verschlossenen Aluminiumtasche bei 4 °C gelagert werden. Innerhalb von maximal 5-10 h nach Defäkation sollte die Aluminiumtasche auf Eis zum Studienzentrum transportiert werden. Die Eltern wurden mit den notwendigen Utensilien ausgestattet.

Nachdem das klinische Studienpersonal die frische Fäzesprobe mit einem Löffel homogenisiert hatte, wurde der pH-Wert mittels pH-Meter bestimmt. Anschließend wurde die Fäzesprobe für die verschiedenen zu ermittelnden Parameter auf Reaktionsgefäße aufgeteilt, wenn notwendig mit dem jeweiligen Puffer vermischt und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert (**Abb. 2.2**). Für die Untersuchung der intestinalen Mikrobiota waren 0,5 g Fäzes vorgesehen. Um die Überlebensfähigkeit des probiotischen Stammes CNCM I-3446 nach der Darmpassage untersuchen zu können, wurden 0,5 g Fäzes und 0,5 ml Ringerlösung (**Anhang Tab. A2**) mit Glycerin (10%) vermischt. Für die Bestimmung des Trockenmasseanteils waren 1 g Fäzes eingeplant. Für die Messung der Konzentration von Gesamt-sekretorischem Immunglobulin A (sIgA), α_1 -Antitrypsin (AAT) und löslichen Gesamtproteinen wurden 0,5 g Fäzes mit 1 ml Extraktionspuffer einschließlich Trypsin-Inhibitor (**Anhang Tab. A3**) versetzt, um einen tryptischen Verdau der Proteine zu verhindern. Die Fäzesprobe wurde mit dem Extraktionspuffer für 1-2 min durch Vortexen vermischt. Fäzespartikel wurden durch einen Zentrifugationsschritt für 15 min bei $13000 \times g$ und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde für die Analyse der immunologischen Parameter aliquotiert (je 300 μ l für sIgA und AAT, 200 μ l für Gesamtproteine). Da die Fäzes-Menge oft limitiert war, wurden die Mengen entsprechend der Priorität der Analysen, wie in **Abb. 2.2** dargestellt, verarbeitet. Die Fäzesproben der Studienzentren in Marseille wurden zentral in einem Labor aufgearbeitet (Hôpital Saint Joseph, 26 Boulevard de Louvain, 13008 Marseille/Frankreich).

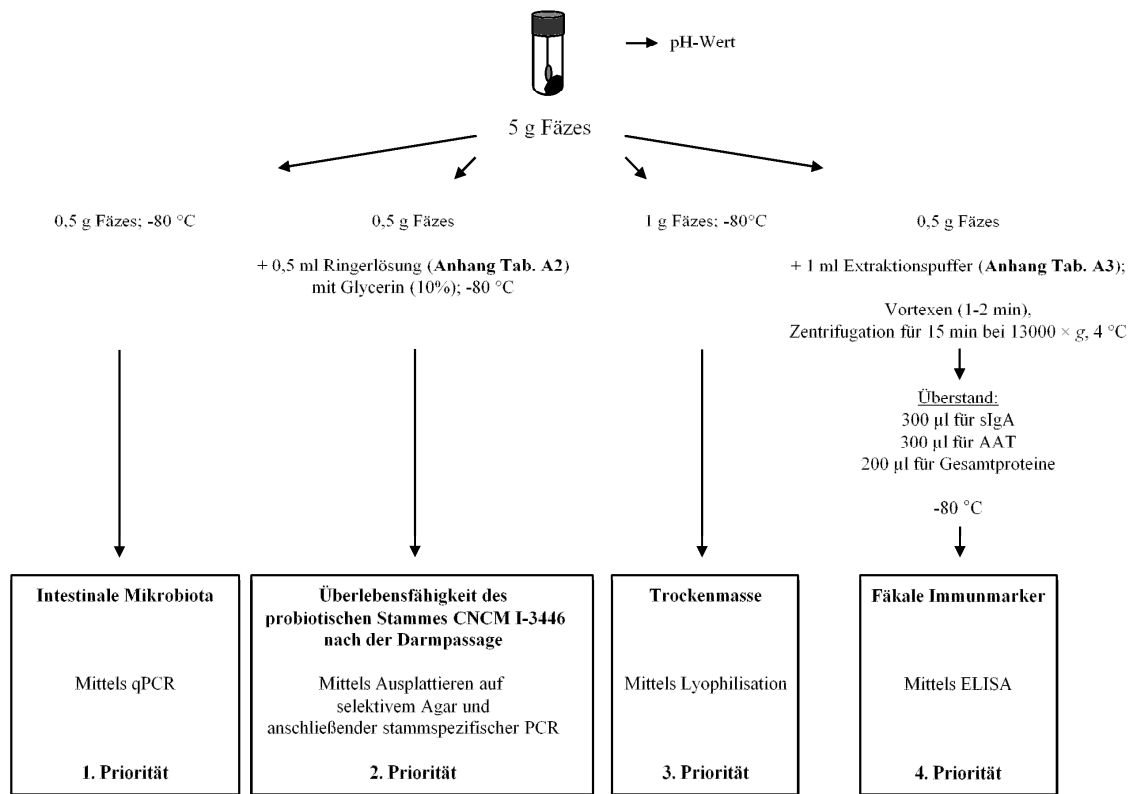


Abbildung 2.2. Verarbeitung der Fäzesproben für die Analyse. AAT, α_1 -Antitrypsin; ELISA, engl. *Enzyme-Linked-Immunesorbent-Verfahren*; qPCR, quantitative Real-Time PCR; sIgA, sekretorisches Immunglobulin A

2.2 Bakterienstämme und Kultivierungsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in **Tab. 2.1** aufgeführt.

Tabelle 2.1. Verwendete Stämme

Bakterienart	Stamm^a
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	DSM 2079 ^T
<i>Bacteroides vulgatus</i>	DSM 1447 ^T
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	DSM 20083 ^T , DSM 20086
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC 27535 ^T , DSM 20225
<i>Bifidobacterium animalis</i>	DSM 20105
<i>ssp. animalis</i>	DSM 20104 ^T
<i>ssp. lactis</i>	DSM 10140 ^T
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM 20456 ^T , DSM 20215, DSM 20239
<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 20213 ^T , DSM 20091
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC 27539 ^T , DSM 20224
<i>Bifidobacterium dentium</i>	ATCC 27534 ^T , ATCC 27678, DSM 20084
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	DSM 20093 ^T
<i>Bifidobacterium longum</i>	
<i>ssp. longum</i>	ATCC 15707 ^T
<i>ssp. suis</i>	DSM 20211 ^T
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	ATCC 27919 ^T , DSM 20439
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	
<i>ssp. globosum</i>	DSM 20092 ^T
<i>ssp. pseudolongum</i>	ATCC 25526 ^T , DSM 20094
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	DSM 20210 ^T , DSM 20209, DSM 20212
<i>Blautia producta</i>	DSM 2950 ^T
<i>Clostridium histolyticum</i>	DSM 2158 ^T
<i>Clostridium difficile</i>	DSM 1296 ^T
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30083 ^T
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	DSM 17677
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	DSM 20079 ^T
<i>Lactobacillus gasseri</i>	DSM 20243 ^T
<i>Ruminococcus albus</i>	DSM 20455 ^T
<i>Ruminococcus gnavreaii</i>	DSM 19829 ^T
<i>Staphylococcus aureus ssp. aureus</i>	DSM 20231 ^T
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	DSM 1798

^a Stämme wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) und der Amerikanischen Stammkultursammlung (ATCC, Manassas, VA, USA) bezogen.

^T Typstamm

Die Anzucht der in **Tab. 2.1** aufgelisteten Bakterienstämme erfolgte im Wesentlichen nach der Hungate-Technik (Bryant 1972). Dabei wurden die Bakterien anaerob in einem Stickstoff/Kohlendioxid-Gasgemisch (80:20 [vol/vol]) in 15-ml Kulturröhrchen, die mit Schraubdeckel und Butylgummi-Septen verschlossen und mit 10 ml ST-Medium (**Anhang Tab. A4**) bzw. 496 YCFA GSC-Medium (*F. prausnitzii*, **Anhang Tab. A5**) gefüllt waren, bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Reinheit der Stämme wurde durch Gram-Färbung und Ausplattieren auf nicht-selektiven Columbia Agar-Platten (BioMérieux, Wien, Österreich) mit anschließender aerober sowie anaerober Inkubation bei 37 °C nachgewiesen. Die Identität der verwendeten Referenzstämme (**Tab. 2.3**, **Tab. 2.7**) wurde durch 16S rRNA-Gensequenzierung auf Speziesebene bestätigt.

2.3 Extraktion genomischer DNA aus Bakterienkulturen

Die genomische DNA der Bifidobakterienstämme (**Tab. 2.1**) wurde mit dem DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben für grampositive Bakterien extrahiert. Da die genomische DNA der Referenzstämme für die acht ausgewählten Taxa (**Tab. 2.3**) als Standards in der qPCR eingesetzt werden sollten, wurden hohe Ausbeuten an DNA benötigt. Diese wurden mit dem RTP® Invitek Bacteria Mini Kit (Invitrogen, Darmstadt) entsprechend den Herstellerangaben für grampositive Bakterien erhalten, wobei das Protokoll bezüglich der Zellyse modifiziert wurde. Nach der im Protokoll vorgesehenen enzymatischen Lyse der Zellen wurde die Suspension einem zusätzlichen mechanischen Aufschluss unterzogen. Dafür wurden die gramnegativen Bakterien (*B. vulgatus*, *E. coli*, *F. prausnitzii*) in einem 2-ml Reaktionsgefäß mit 750 mg Zirkonia/Silika-Kügelchen (0,1 mm Durchmesser; Roth, Karlsruhe) mittels Fastprep™ FP120 Gerät (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) für 4 min und die grampositiven Bakterien (*B. longum* ssp. *longum*, *C. difficile*, *L. acidophilus*, *S. aureus* ssp. *aureus*, *S. epidermidis*) für 8 min bei einer Stärke von 4,0 aufgeschlossen. Die gereinigte DNA wurde in 100 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 (erwärmt auf 56 °C) aufgenommen. Die genomische DNA der restlichen in **Tab. 2.1** aufgeführten Stämme wurde mit dem RTP® Invitek Bacteria Mini Kit (Invitrogen, Darmstadt) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Die Lagerung der bakteriellen DNA erfolgte bei -20 °C.

2.4 16S rRNA-Gensequenzierung

Um die Identität der verwendeten Referenzstämme (**Tab. 2.3, Tab. 2.7**) zu bestätigen, wurde nahezu die gesamte Länge des 16S rRNA-Gens (ca. 1500 bp) mit den universellen Oligonukleotid-Primern 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' und 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' amplifiziert. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt 1 × Taq PCR Puffer (Life Technologies, Darmstadt), 2,5 mM MgCl₂, 250 µM von jedem dNTP (Invitex, Berlin), 100 nM von jedem Primer, 2,5 U Taq Polymerase (Life Technologies, Darmstadt) und 1 µl genomische DNA (30-110 ng). Die Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler (Thermo Hybrid MultiBlock System, Ulm) mit folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt: 94 °C für 4 min, 25 Zyklen bei 94 °C für 1 min, 55 °C für 1 min, 72 °C für 1 min und schließlich 72 °C für 10 min. Die Größe der Amplifikate wurde in einem 1%igen Agarosegel (Serva, Heidelberg) in 1 × TAE-Puffer (**Tab. A6**) nach Ethidiumbromidfärbung und Visualisierung unter UV-Licht bestätigt. Die PCR-Produkte wurden mittels High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben von restlichen Komponenten des Reaktionsansatzes gereinigt und anschließend sequenziert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Verwendung des BLAST Algorithmus (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) mit Einträgen in der GenBank verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Identität der Bakterien wurde auf Speziesebene bestätigt.

2.5 Extraktion bakterieller DNA aus humanen Fäzes

Bakterielle DNA wurde aus einer gefrorenen Fäzesprobe mittels QIAamp DNA Stool Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben extrahiert, wobei das Protokoll bezüglich der Zellyse modifiziert wurde. Zunächst wurden 220 mg Fäzes mit 1,2 ml des durch den Hersteller bereitgestellten Lysispuffers in einem 2-ml Reaktionsgefäß mit 750 mg Zirkonia/Silika-Kügelchen (0,1 mm Durchmesser; Roth, Karlsruhe) für 2 min mit einem Vortexer homogenisiert. Die Suspension wurde einem thermischen Aufschluss von 15 min unter kontinuierlichem Schütteln (1400 min⁻¹, Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) bei 95 °C unterzogen. Die Probe wurde anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Weiterhin erfolgte eine mechanische Lyse der Zellen mittels FastprepTM FP120 (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA) für 8 min und 15 s bei einer Stärke von 4,0.

Die Suspension wurde erneut für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach einem Zentrifugationsschritt ($20000 \times g$, 1 min, 4°C) wurde der Überstand in ein 2-ml Reaktionsgefäß transferiert, wobei die pelletierten Zirkonia/Silika-Kügelchen durch Zugabe von $350 \mu\text{l}$ Lysispuffers und 1 min Vortexen gewaschen wurden. Die resultierende Suspension wurde anschließend für 5 min unter kontinuierlichem Schütteln (1400 min^{-1} , Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) erneut bei 95°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt ($20000 \times g$, 1 min, 4°C) wurden die Überstände vereint. Im Fäzes vorkommende, DNA schädigende Substanzen und PCR Inhibitoren wurden aus der DNA-haltigen Lösung durch Adsorption an eine InhibitEX Matrix, die im o. g. Kit zur Verfügung gestellt wurde, entfernt. Die InhibitEX Matrix wurde durch Zentrifugation bei $20000 \times g$ für 6 min pelletiert und der Überstand abgenommen. Um schließlich die durch qPCR bestimmte Kopienanzahl des Zielgens bzw. die DNA Menge auf 1 g Fäzes beziehen zu können, wurde der Überstand mit $1 \times$ Phosphat-gepufferter Salzlösung (**Anhang Tab. A7**) auf ein definiertes Volumen von 1 ml aufgefüllt. Die DNA im Überstand wurde mittels QIAcube (Qiagen, Hilden) gereinigt und schließlich mit $200 \mu\text{l}$ Reinstwasser von der Silika-basierten Membran eluiert. Da in einigen Fällen die zur Verfügung stehende Fäzesmenge weniger als 220 mg betrug, wurde die Extraktion bakterieller DNA aus geringeren Mengen (110 mg und 55 mg) getestet.

2.6 Erfassung fäkaler Bakterien mittels quantitativer Real-Time PCR

2.6.1 Gesamtbakterien und ausgewählte Taxa

Um ein Profil der fäkalen Mikrobiota zu erhalten, wurden die Zellzahlen von acht Bakteriengruppen, die im humanen Gastrointestinaltrakt dominant (*Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Clostridium leptum*-Gruppe, Enterobacteriaceae, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*) oder von klinischer Relevanz (*Staphylococcus epidermidis*, Toxin B produzierende *Clostridium difficile*-im Folgenden als *C. difficile* bezeichnet) sein können, bestimmt. Die Gesamtbakterienzahl wurde ebenfalls ermittelt. Dafür wurden bereits in der Literatur beschriebene qPCR-Verfahren verwendet (**Tab. 2.2**).

2.6.1.1 Oligonukleotid-Primer

Für die molekulare Erfassung von *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *C. leptum*-Gruppe, Enterobacteriaceae, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* sowie der Gesamtbakterien wurden 16S rRNA-genspezifische Primer genutzt. *C. difficile* wurde anhand des Toxin B kodierenden Gens quantifiziert. Für *S. epidermidis* wurden Primer für die Amplifikation des Gens für die Glutaminsäure-spezifische Serinprotease eingesetzt.

Tabelle 2.2. Oligonukleotid-Primer für die Quantifizierung der Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa

Bakterien	Primer	Sequenz (5'-3') ^a	Zielgen	Primerkonzentration (nM)	Temperaturprogramm	Referenz
Gesamtbakterien	Uni33-IF Uni797R	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAAGGTATCTAATCCTGT	16S rRNA-Gen	300	50 °C 2 min, 95 °C 5 min, 40 x (95 °C 15 s, 60 °C 1 min)	Nadkarni <i>et al.</i> , 2002
Bacteroidetes	Bact934F Bact1060R	GGARCATGTGGTTTAATTCGATGAT AGCTGACGACAACCATGCAG	16S rRNA-Gen	300	50 °C 2 min, 95 °C 5 min, 40 x (95 °C 15 s, 60 °C 1 min)	Guo <i>et al.</i> , 2008
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F g-Bifid-R	CTCCTGGAACGGGTGG GGTGTCTTCCCGATATCTACA	16S rRNA-Gen	250	94 °C 5 min, 40 x (94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 50 s)	Matsuki <i>et al.</i> , 2002
<i>Clostridium leptum</i> -Gruppe	sg-Clept-F sg-Clept-R3	GCACAAGCAGTGGAGT CTTCTCCGTTTTGTCAA	16S rRNA-Gen	250	95 °C 5 min, 40 x (94 °C 20 s, 50 °C 20 s, 72 °C 50 s)	Matsuki <i>et al.</i> , 2004
Enterobacteriaceae	Eco 1457F Eco 1652R	CAITGACGTTACCCGCAGAAGAAGC CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	16S rRNA-Gen	500	95 °C 3 min, 35 x (95 °C 30 s, 63 °C 30 s)	Bartosch <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus</i> ^b	LactobF LactobR	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	16S rRNA-Gen	500	95 °C 5 min, 35 x (95 °C 15 s, 58 °C 20 s, 72 °C 45 s)	Walter <i>et al.</i> , 2001, Heilig <i>et al.</i> , 2002
<i>Staphylococcus</i>	STPYF STPYR2	ACGGTCTTGCTGTCACITATA TACACATAATGTTCTTCCCTAATAA	16S rRNA-Gen	600	95 °C 5 min, 40 x (95 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 50 s)	Matsuda <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium difficile</i> (Toxin B Produzierer)	tcdB-1F tcdB-1R	GAAGGTGGTTCAGGTCATAC CATTCTAAGCTTCTTAAACCTG	Toxin B-Gen	500	95 °C 5 min, 40 x (95 °C 15 s, 62 °C 15 s, 72 °C 15 s)	Peterson <i>et al.</i> , 2007
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	StaphEpiF StaphEpiR	GGCAAAATTTGTGGGTCAAGA TGGCTAATGGTTTGTCAACA	Glutaminsäure-spezifische Serinprotease Gen	300	50 °C 2min, 95 °C 5 min, 40 x (95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s)	Byrne <i>et al.</i> , 2007

^aIUPAC Mehrdeutigkeitscode: R (A,G).^bSchließt die Gattungen *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedococcus* und *Weissella* ein (Satokari *et al.*, 2003).

2.6.1.2 Herstellung der Quantifizierungsstandards

Für die Quantifizierung der Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa wurden als Quantifizierungsstandards genomische DNA von Stämmen verwendet, die als häufigste Vertreter dieser Gruppen in der Probe vermutet wurden (hier als Referenzstämme bezeichnet, **Tab. 2.3**). Damit wurde versucht, die variierende Kopienzahl des 16S rRNA-Gens innerhalb der Gesamtbakterien bzw. des Taxons entsprechend zu berücksichtigen (Nadkarni *et al.*, 2002).

Tabelle 2.3. Referenzstämme für die Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa

Taxon/Gesamtbakterien	Referenzstamm
Bacteroidetes	<i>B. vulgatus</i> DSM 1447 ^T
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ATCC 15707 ^T
<i>Clostridium leptum</i> -Gruppe	<i>F. prausnitzii</i> DSM 17677
Enterobacteriaceae/Gesamtbakterien	<i>E. coli</i> DSM 30083 ^T
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> DSM 20079 ^T
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> ssp. <i>aureus</i> DSM 20231 ^T
<i>Clostridium difficile</i>	<i>C. difficile</i> DSM 1296 ^T
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> DSM 1798

Nach Extraktion und Reinigung der genomischen DNA der Referenzstämme wurde die DNA-Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt (NanoDropTM, Peqlab, Erlangen). Die Größen komplett sequenzierter Genome, deren Sequenzen in der GenBank (Benson *et al.*, 2011) hinterlegt waren, wurden zur Berechnung einer durchschnittlichen Genomgröße der zu untersuchenden bakteriellen Zielgruppen herangezogen. Anschließend wurden die durchschnittlichen Genommassen für die Gesamtbakterien und ausgewählten Bakteriengruppen (**Tab. 2.4**) wie folgt berechnet:

$$(\text{Genomgröße} \times M_{\text{Basenpaar}}) / N_A = \text{Genommasse};$$

$M_{\text{Basenpaar}}$, durchschnittliche molare Masse eines Basenpaars (660 g/mol); N_A , Avogadro Konstante ($6,022 \times 10^{23}$ Moleküle/mol).

Tabelle 2.4. Durchschnittliche Größe und Masse der Genome von Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa

Taxon/Gesamtbakterien	Genom	
	Größe (Mb) ^a	Masse (fg) ^b
Bacteroidetes	5,08	5,57
<i>Bifidobacterium</i>	2,25	2,47
<i>Clostridium leptum</i> -Gruppe	3,36	3,68
Enterobacteriaceae/Gesamtbakterien	4,93	5,40
<i>Lactobacillus</i>	2,33	2,55
<i>Staphylococcus</i>	2,80	3,07
<i>Clostridium difficile</i>	4,15	4,55
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,54	2,78

^a Durchschnittliche Genomgröße, ermittelt über Einträge in der GenBank komplett sequenzierter Genome.

^b Durchschnittliche Genommasse, ermittelt über Genomgröße und durchschnittliche molare Masse eines Basenpaares (660 g/mol).

Die Anzahl der bakteriellen Genome je Volumen gereinigter DNA wurde wie folgt berechnet:

$$c_{\text{genomische DNA}} \text{ (g/L)} / \text{Genommasse} = c_{\text{genomische DNA}} \text{ (Genome/L)};$$

$c_{\text{genomische DNA}} \text{ (g/L)}$, spektrophotometrisch bestimmte Konzentration der DNA-Lösung.

Unter der Annahme, dass pro Zelle ein bakterielles Genom vorhanden ist, wurde die Zellzahl der Bakterienpopulationen in den Fäzesproben über die Anzahl bakterieller Genome bestimmt. Die Konzentration des hergestellten Quantifizierungsstandards wurde mittels Duplikat bestätigt. Quantifizierungsstandards wurden in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aliquotiert bei -20 °C gelagert und direkt vor einem qPCR-Lauf 10-fach seriell in Reinstwasser verdünnt. Die C_T -Werte der Quantifizierungsstandards war unter den qPCR-Läufen vergleichbar (Differenz < 0,5), woraus geschlossen werden konnte, dass die Standards während der Lagerung stabil blieben.

2.6.2 Bifidobakterienspezies

Für die quantitative Erfassung der fäkalen Bifidobakteriendiversität wurden auf der Basis des *groEL*-Gens qPCR-Verfahren etabliert und validiert.

2.6.2.1 *GroEL*-Sequenzanalyse und Ableitung speziesspezifischer Oligonukleotid-Primer

GroEL-Sequenzen der zu untersuchenden Bifidobacterienspezies (**Tab. 2.5**) wurden der GenBank Version 185,0 (Benson *et al.*, 2011) entnommen und einem multiplen Sequenzabgleich mittels ClustalW2 Version 2,1 (Larkin *et al.*, 2007), bereitgestellt durch das *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk>), unterzogen.

Tabelle 2.5. Bifidobakterien *groEL*-Sequenzen, die für die Ableitung speziesspezifischer Oligonukleotid-Primer genutzt wurden

<i>Bifidobacterium</i> sp.	Stamm	GenBank Akzessionsnr.	Größe (bp)
<i>B. adolescentis</i>	JCM 1275 ^T	AF210319	1749 ^a
	ATCC 15703 ^T	AP009256	1617 ^a
<i>B. angulatum</i>	JCM 7096 ^T	AF240568	590 ^b
<i>B. animalis</i>	B83	AY166539	590 ^b
	D1	AY166540	590 ^b
	III-1	AY166541	590 ^b
	III-6	AY166542	590 ^b
ssp. <i>animalis</i>	JCM 1190 ^T	AY004273	590 ^b
	ATCC 25527 ^T	AY488178	1155 ^b
	TEEV 1/10	HQ851043	587 ^b
	TEEV 3/10	HQ851044	598 ^b
	TEEV 1/11	HQ851047	586 ^b
	TEEV 4/9 AG	HQ851048	608 ^b
ssp. <i>lactis</i>	HN019	ABOT01000006	1614 ^a
	9952	AF286735	590 ^b
	DSM 10140 ^T	AY004282	1614 ^a
	9950	AY004287	590 ^b
	JB-1	AY166543	590 ^b
	NCC 363	AY488176	1155 ^b
	NCC 402	AY488177	1155 ^b
	DSM 27674	AY488179	1155 ^b
	DSM 10140 ^T	AY488180	1155 ^b
	ATCC 27536	AY488181	1155 ^b
	NCC 239	AY488182	1155 ^b
	ATCC 27672	AY488183	1155 ^b
	LMG 18906	AY586539	1614 ^a
	AD011	CP001213	1614 ^a
	BI-04 ATCC SD5219	CP001515	1614 ^a
	DSM 10140 ^T	CP001606	1614 ^a
	BB-12	CP001853	1614 ^a
	V9	CP001892	1614 ^a
	CNCM I-2494	CP002915	1614 ^a
BLC1	CP003039	1614 ^a	
<i>B. bifidum</i>	JCM 1255 ^T	AY004280	590 ^b
	PRL2010	CP001840	1626 ^a
	S17	CP002220	1626 ^a

Tabelle 2.5. (Fortsetzung)

<i>B. breve</i>	DSM 20213 ^T	ACCG02000012	1626 ^a
	DSM 20213 ^T	AF240566	584 ^b
<i>B. catenulatum</i>	JCM 1194 ^T	AY004272	590 ^b
	JCM 7130	AY166565	590 ^b
<i>B. dentium</i>	ATCC 27679	AEEQ01000009	1617 ^a
	JCVIHMP022	AEHJ01000021	1617 ^a
	JCM 1195 ^T	AF240572	590 ^b
<i>B. gallicum</i>	DSM 20093 ^T	ABXB03000002	1611 ^a
	JCM 8224 ^T	AF240575	592 ^b
<i>B. longum</i>	N10	FJ577573	552 ^b
	N103	FJ577576	552 ^b
	N81	FJ577625	552 ^b
	N86	FJ577629	552 ^b
	N88	FJ577630	564 ^b
<i>ssp. infantis</i>	JCM 1210	AF240576	591 ^b
	JCM 1222 ^T	AF240577	591 ^b
	ATCC 15697 ^T	AP010889	1626 ^a
	157F	AP010890	1626 ^a
	9901	AY004286	591 ^b
	bb52	AY004288	591 ^b
	6w-50	AY166564	590 ^b
	D6-9-6	AY166566	590 ^b
	D30-3-3	AY166567	590 ^b
	D30-3-10	AY166568	590 ^b
	D30-3-11	AY166569	590 ^b
	L2	AY166570	590 ^b
	ATCC 15697 ^T	CP001095	1626 ^a
	<i>ssp. longum</i>	ATCC 55813	ACHI01000023
NCC 2705		AE014295	1626 ^a
JCM 1217 ^T		AF240578	590 ^b
L4		AY166571	590 ^b
TJ		AY166572	593 ^b
JCM 7052		AY166573	590 ^b
JCM 7053		AY166574	590 ^b
ATCC 15707 ^T		AY835622	552 ^b
DJO10A		CP000605	1626 ^a
JDM 301		CP002010	1626 ^a
BBMN 68		CP002286	1626 ^a
KACC 91563		CP002794	1626 ^a
F8		FP929034	1626 ^a
R0175		HM009034	1626 ^a
<i>ssp. suis</i>	JCM 1269 ^T	AY013248	591 ^b
	JCM 7139	AY166575	590 ^b
	TEEV 4/9	HQ851041	590 ^b

Tabelle 2.5. (Fortsetzung)

<i>B. pseudocatenulatum</i>		DSM 20438 ^T	AY004274	589 ^b
		JCM 7040	AY166552	590 ^b
		T1-3-15	AY166553	590 ^b
		T2-3-4	AY166554	590 ^b
		Z2-3	AY166555	590 ^b
<i>B. pseudolongum</i>	ssp. <i>globosum</i>	JCM 5820 ^T	AF286736	591 ^b
		1-23-3	AY166544	590 ^b
		1-25-3	AY166545	590 ^b
		02-2	AY166546	590 ^b
		7#-3-7	AY166547	590 ^b
		7#-10-11	AY166548	590 ^b
		09-25-2	AY166549	590 ^b
		Fb9	AY166550	590 ^b
	MU8	AY166551	590 ^b	
	ssp. <i>pseudolongum</i>	JCM 1205 ^T	AF240573	591 ^b
<i>B. thermophilum</i>		JCM 1207 ^T	AF240567	591 ^b
		RBL67	DQ340558	590 ^b

^a Komplette Gensequenz.

^b Partielle Gensequenz.

^T Typstamm; bp, Basenpaare.

Ein Bereich von ungefähr 600 bp, der zwischen den Nukleotidpositionen von ~250-840 des kompletten *groEL*-Gens von ca. 1600 bp lokalisiert ist, wurde für die Suche nach diskriminierenden Sequenzen für die speziesspezifische Detektion der Bifidobakterien ausgewählt. Auf der Basis von 97 partiellen und kompletten *groEL*-Sequenzen (**Tab. 2.5**) wurden manuell Oligonukleotid-Primer für zwölf Bifidobakterienspezies (**Tab. 2.6**) abgeleitet.

Tabelle 2.6. Speziespezifische Oligonukleotid-Primer für Bifidobakterien (basierend auf dem *groEL*-Gen)^a

Zielorganismus	Primer	Sequenz (5'-3') ^b	Primerkonzentration (nM)	Annealing-Temperatur (°C)	Amplikon	
					Größe (bp)	Schmelztemperatur (°C)
<i>B. adolescentis</i>	B_ado-f	CTCCGCCGCTGATCCGGAAGTCG	300	75	268	88,0
	B_ado-r	AACCAACTCGGCGATGTGGACGACA				
<i>B. angulatum</i>	B_ang-f	CTGTCCTCCCAGCAGGACGTGGTC	300	80	97	85,5
	B_ang-r	GCGCTTCGCCGTCAACGTCTTCGG				
<i>B. animalis</i>	B_ani-f	CACCAATGCGGAAGACCAG	250	64	184	87,5
	B_ani-r	GTTGTTGAGAATCAGCGTGG				
<i>B. bifidum</i>	B_bif-f	CTCCGCAGCCGACCCCGAGGTT	300	64	233	88,5
	B_bif-r	TGGAACCTTGCCGGAGGTCAGG				
<i>B. breve</i>	B_bre-f	GCTCGTCGTTGCCGCAAGGACGTT	300	72	272	88,0
	B_bre-r	ACAGAATGTACGGATCCTCGAGCACG				
<i>B. catenulatum</i>	B_cat-f	GGCTATCGTCAAGGAGCTCA	300	64	188	87,0
	B_cat-r	AGTCCAGATCCAAACCGAAAC				
<i>B. dentium</i>	B_den-f	GGCCAGTCTTTGGTGCATGAAGGCC	300	75	364	89,5
	B_den-r	GTCTTCGAGCACCGCGTCTGGTCC				
<i>B. gallicum</i>	B_gal-f	AGCTCGTCAAGTCCGCCAAGC	300	68	188	87,5
	B_gal-r	CATACCTTCGGTGAAGTTCGAGG				
<i>B. longum</i>	B_lon-f	CGGCGTYGTGACCGTTGAAGAC	250	70	259	88,0
	B_lon-r	TGYTTCGCCRTCAGACGTCTCA				
<i>B. pseudocatenulatum</i>	B_pcat-f	AGCCATCGTCAAGGAGCTTATCGCAG	250	68	325	87,5
	B_pcat-r	CACGACGTCCTGCTGAGAGCTCAC				
<i>B. pseudolongum</i>	B_plon-f	CRATYGTCAAGGAACTYGTGGCCT	300	66	312	89,0
	B_plon-r	GCTGCGAMGAKACCTTGCCGCT				
<i>B. thermophilum</i>	B_the-f	ACTGGTCGCTTCGCCAAGGATG	300	66	326	88,0
	B_the-r	CCARGTCAGCMAGGTGRACGATG				

^a Bindesequenzen liegen zwischen den Positionen von ~250-840 der zugehörigen Nukleotidsequenz.

^b IUPAC Mehrdeutigkeitscode: M (A,C); K (G,T); R (A,G); Y (C,T).

f, Forward-Primer; r, Reverser-Primer; bp, Basenpaare

Der multiple Sequenzabgleich der *groEL*-Sequenzen von den zu untersuchenden Bifidobakterienspezies sowie die Lage der speziespezifischen Oligonukleotid-Primer sind im **Anhang Abb. A1** dargestellt.

2.6.2.2 Herstellung der Quantifizierungsstandards

Für die Zellzahlbestimmung der zu untersuchenden Bifidobakterienspezies wurden Stämme ausgewählt, die die jeweilige Spezies repräsentieren (hier als Referenzstämme bezeichnet, **Tab. 2.7**).

Tabelle 2.7. Referenzstämme der zu untersuchenden Bifidobakterienspezies

<i>Bifidobacterium</i> sp.	Referenzstamm
<i>B. adolescentis</i>	<i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ^T
<i>B. angulatum</i>	<i>B. angulatum</i> ATCC 27535 ^T
<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 ^T
<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i> DSM 20456 ^T
<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i> DSM 20213 ^T
<i>B. catenulatum</i>	<i>B. catenulatum</i> ATCC 27539 ^T
<i>B. dentium</i>	<i>B. dentium</i> ATCC 27534 ^T
<i>B. gallicum</i>	<i>B. gallicum</i> DSM 20093 ^T
<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ATCC 15707 ^T
<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i> ATCC 27919 ^T
<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i> ATCC 25526 ^T
<i>B. thermophilum</i>	<i>B. thermophilum</i> DSM 20210 ^T

Als Quantifizierungsstandards wurden PCR-Produkte mit der jeweiligen Zielsequenz eingesetzt. Dafür wurde ein Teil des *groEL*-Gens der Referenzstämme mit Oligonukleotid-Primern amplifiziert, die komplementär zu einer Sequenz von mindestens 17 bp vor bzw. nach den Bindesequenzen der speziesspezifischen Oligonukleotid-Primer liegen (**Abb. 2.3, Anhang Abb. A2**). Die zusätzlichen Basenpaare sollten einem terminalen hydrolytischen Abbau der Primerbindesequenzen für die speziesspezifische Detektion vorbeugen und damit die Stabilität der Standards während der Lagerung gewährleisten.

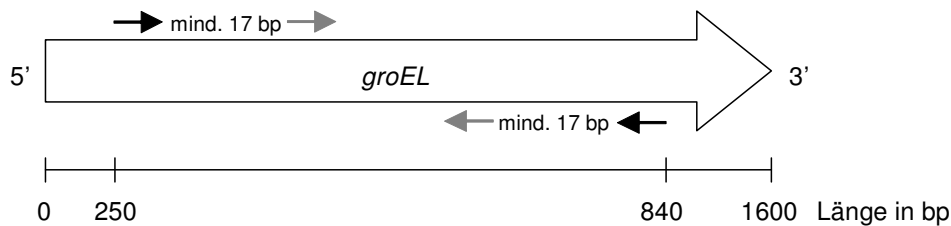


Abbildung 2.3. Schematische Lage der Oligonukleotid-Primerbindestellen im *groEL*-Gen für die Herstellung der Quantifizierungsstandards zur Quantifizierung von Bifidobaktérienspezies (schwarze Pfeile, **Tab. 2.8**). Die Bindestellen der Oligonukleotid-Primer für die speziesspezifische Detektion (graue Pfeile, **Tab. 2.6**) sind durch mindestens 17 zusätzliche Basenpaare vor einem möglichen terminalen hydrolytischen Abbau während der Lagerung geschützt.

Ein Reaktionsansatz von 50 μl umfasste 1 \times TopTaq PCR Puffer (Qiagen, Hilden), 200 μM von jedem dNTP (Invitak, Berlin; 250 μM für *B. pseudocatenulatum*), 200 nM von jedem Primer (**Tab. 2.8**), 1,25 U TopTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden) und 1 μl genomische DNA (30-110 ng) von einem der Referenzstämme (**Tab. 2.7**). Die Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler (Thermo Hybaid MultiBlock System, Ulm) unter den in **Tab. 2.8** angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Größe der Amplifikate wurde in einem 1%igen Agarosegel (Serva, Heidelberg) in 1 \times TAE-Puffer (**Anhang Tab. A6**) nach Ethidiumbromidfärbung und Visualisierung unter UV-Licht bestätigt. Die PCR-Produkte wurden mittels High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) gemäß den Herstellerangaben von restlichen Komponenten des Reaktionsansatzes gereinigt. Die Konzentration der amplifizierten Produkte wurde spektrophotometrisch bei 260 nm (NanoDropTM, Peqlab, Erlangen) gemessen. Die Anzahl der PCR-Produkte (oder partiellen *groEL*-Genkopien) je Volumen gereinigter DNA-Lösung wurde wie folgt berechnet:

$$(i) \ c_{\text{Amplikon}} (\text{g/L}) / M_{\text{Amplikon}} (\text{g/mol}) = c_{\text{Amplikon}} (\text{mol/L})$$

$$(ii) \ c_{\text{Amplikon}} (\text{mol/L}) \times N_{\text{A}} = c_{\text{Amplikon}} (\text{Moleküle/L});$$

$c_{\text{Amplikon}} (\text{g/L})$, spektrophotometrisch bestimmte Konzentration der DNA-haltigen Lösung; M_{Amplikon} , molare Masse des spezifischen Amplikons (**Tab. 2.8**); N_{A} , Avogadro Konstante ($6,022 \times 10^{23}$ Moleküle/mol).

Die Identität der generierten Quantifizierungsstandards wurde durch Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) bestätigt.

Tabelle 2.8. Oligonukleotid-Primer für die Herstellung der Quantifizierungsstandards zur spezifischen Quantifizierung von Bifidobacterienspezies^a

Zielorganismus	Primer	Sequenz (5'-3')	PCR-Bedingungen	Amplikon	
				Größe (bp)	Molare Masse (g/mol) ^b
<i>B. adolescentis</i>	B_ado-std-f B_ado-std-r	GATCAGATCGCTGCCACCGCAAC ATCAGCAGCGGCTTGCCGGTCTT	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 69 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	320	197799,00
<i>B. angulatum</i>	B_ang-std-f B_ang-std-r	AGTGCTCGAAGACCCGTACATCCT GGATGTTGTTCAAGATCAGGGTCCG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	164	101387,60
<i>B. animalis</i>	B_ani-std-f B_ani-std-r	GTCACCGTCGAAGACAACAACC CAGGACTTGAAGGTGCCACGG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	299	184812,60
<i>B. bifidum</i>	B_bif-std-f B_bif-std-r	CAAGGACGTGGAGACCAAG CTTGTTCAAGATGAGGGTCCG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	391	241687,40
<i>B. breve</i>	B_bre-std-f B_bre-std-r	CCACCGAGGTCATCGTC TGCTGGGAGGAGACCTTG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 20 s, 58 °C 20 s, 72 °C 20 s), 72 °C 10 min	322	199032,80
<i>B. catenulatum</i>	B_cat-std-f B_cat-std-r	GTCGTGGTATCGAGAAG TAGCCCTTGTCGAAACG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 47 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	244	150819,60
<i>B. dentium</i>	B_den-std-f B_den-std-r	CCACTACCGCAACTGTGCTG GTCAGGAGGATGTACGGGTC	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 50 s, 62 °C 50 s, 72 °C 50 s), 72 °C 10 min	400	247244,00
<i>B. gallicum</i>	B_gal-std-f B_gal-std-r	TGAGAAGGCTTCCGACG GGGAGATGTAGCCCTTG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	242	149590,80
<i>B. longum</i>	B_lon-std-f B_lon-std-r	CTGAGGCTCTGGACAAGGTCG GGTGCCACGGATGTTGTTCCAGG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	323	199651,20
<i>B. pseudocatenulatum</i>	B_pcat-std-f B_pcat-std-r	CGTCGTGGTATCGAGAAGGCTTCCG AAGGTCGGCAGAGCCTCGCCAT	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 50 s, 64 °C 50 s, 72 °C 50 s), 72 °C 10 min	434	268244,60
<i>B. pseudolongum</i>	B_plon-std-f B_plon-std-r	CCTCAAGAACGTTGTGGC CCGGTCTTCATCACGAG	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 30 s, 49 °C 30 s, 72 °C 30 s), 72 °C 10 min	420	259607,00
<i>B. thermophilum</i>	B_the-std-f B_the-std-r	GAAGGCCTGAAGAACGTGGTCCG TCAGCCACGATCAGCAGCGGA	94 °C 3 min, 30 x (94 °C 40 s, 65 °C 40 s, 72 °C 40 s), 72 °C 10 min	449	277522,60

^a Lage der Oligonukleotid-Primerbindestellen mindestens 17 bp vor bzw. nach den Bindesequenzen der speziesspezifischen Oligonukleotid-Primer, um die Stabilität des Quantifizierungsstandards zu gewährleisten.

^b Bezogen auf das doppelsträngige Amplikon.

f, Forward-Primer; r, Reverse-Primer; bp, Basenpaare

Unter der Annahme, dass pro Zelle eine Genkopie von *groEL* vorhanden ist, wurde die Zellzahl der Bifidobacterienspezies in den Fäzesproben über die Anzahl der *groEL*-Genkopien bestimmt. Die Konzentration der hergestellten Quantifizierungsstandards wurde mittels Duplikat bestätigt. Quantifizierungsstandards wurden in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aliquotiert bei -20 °C gelagert und direkt vor einem qPCR-Lauf 10-fach seriell in Reinstwasser verdünnt. Die C_T-Werte der Quantifizierungsstandards waren unter den qPCR-Läufen vergleichbar (Differenz < 0,5), woraus geschlossen werden konnte, dass die Standards während der Lagerung stabil blieben.

2.6.3 Quantitative Real-Time PCR-Bedingungen

QPCR-Läufe wurden mit 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Life Technologies, Darmstadt) und der 7500 Software Version 2.0.5 durchgeführt und analysiert. Die Reaktionsansätze von 25 µl wurden als Triplikate in 96er-Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht) gemessen. Ein Reaktionsansatz enthielt 1 × QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (HotStarTaq[®] Plus DNA Polymerase, QuantiFast SYBR Green PCR Puffer, dNTP Mix, SYBR Green I, ROX), 250-600 nM von jedem Primer eines Paares (**Tab. 2.2**, **Tab. 2.6**) und 1 µl DNA. ROX diente als passiver Referenzfarbstoff zur Normalisierung von Fluoreszenzdifferenzen zwischen den Vertiefungen einer Platte, die z. B. auf Pipettierfehler zurückzuführen waren. Die Temperaturprogramme für die Quantifizierung der Gesamtbakterien und ausgewählten Bakteriengruppen sind in **Tab. 2.2** aufgeführt. Die entwickelten Temperaturprogramme für die spezifische Quantifizierung von Bifidobakterienspezies umfassten (**Tab. 2.6**): 95 °C für 5 min, 40 Zyklen mit 94 °C für 15 s, 64-80 °C für 15 s, 72 °C für 15 s und 83 °C für 15 s. Die Fluoreszenzsignale von SYBR Green I bei Einlagerung in doppelsträngige DNA wurden nach jedem Amplifikationszyklus während eines zusätzlichen Schrittes von 83 °C gemessen. Die erhöhte Temperatur von 83 °C führt zum Aufschmelzen von unerwünschten kleineren PCR-Produkten und Primerdimeren, so dass deren unspezifische Fluoreszenzsignale von der Detektion ausgeschlossen werden können (Pfaffl 2001). Im Anschluss an die Reaktion wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde die Temperatur schrittweise von 68 °C auf 95 °C (Inkrement von 1%, Intervall 10 s) erhöht, während die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wurde. Dadurch konnte das spezifische PCR-Produkt anhand seiner spezifischen Schmelztemperatur (**Tab. 2.6**) von möglichen unspezifischen Produkten unterschieden werden. Die Hintergrundfluoreszenz wurde in der Anfangsphase der Reaktion zwischen den Zyklen 3 und 10 detektiert. Der Schwellenwert wurde in der exponentiellen Phase bei 0,01 (Bifidobakterienspezies) und bei 0,05 (Gesamtbakterien/ausgewählte Taxa) relative Fluoreszenz gesetzt. Schwellenwertzyklen (C_T ; PCR-Zyklus, ab welchem die SYBR Green I Fluoreszenz den gewählten Schwellenwert oberhalb der berechneten Hintergrundfluoreszenz überschreitet (Bustin und Nolan 2004), kleiner als 11 und größer als 33 wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Anzahl der *groEL*-Genkopien oder der bakteriellen Genome in einer Fäzesprobe wurde mittels einer Kalibriergeraden ermittelt. Um eine Kalibriergeraden zu erstellen, wurden die

C_T -Werte von 10-fach seriellen Verdünnungen der Quantifizierungsstandards als eine lineare Funktion des dekadischen Logarithmus bekannter Konzentration aufgetragen. In jeder Messung wurden mindestens fünf Konzentrationen des Standards mitgeführt, die den Konzentrationsbereich der Probe abdeckten.

2.7 Fäzesproben von Erwachsenen

Zur Validierung der entwickelten qPCR-Verfahren für Bifidobakterienspezies und zur Überprüfung, ob Störungen der Bestimmung durch PCR-Inhibitoren ausgeschlossen werden können, wurden Fäzesproben von Erwachsenen genutzt. Vier gesunde Erwachsene im Alter von 20-40 Jahren aus dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke (zwei Frauen, zwei Männer) stellten freiwillig Fäzesproben zur Verfügung. Die Spender hatten zum Zeitpunkt der Probensammlung weder akute noch chronische Darmerkrankungen und unterzogen sich keiner Antibiotikatherapie in einem Zeitraum von sechs Monaten vor Abgabe der Fäzesprobe. Die Fäzesproben wurden innerhalb von zwei Stunden nach Defäkation bei -20 °C gelagert.

2.8 Thoma-Zeiss-Zählkammer und *Spiking*-Experimente

Für die Validierung (Reproduzierbarkeit, Referenzmethode) und das Ermitteln der Bestimmungsgrenzen aller entwickelten qPCR-Verfahren wurden Fäzesproben mit einer bekannten Anzahl an Bifidobakterienzellen versetzt (*Spiking*). Dafür wurden unter Anwendung der speziesspezifischen qPCR-Verfahren zunächst Fäzesproben von zwei Erwachsenen auf die Abwesenheit der zu untersuchenden Bifidobakterienspezies (**Tab. 2.7**) getestet. Anschließend wurden zu je 220 mg Fäzes 10-fach serielle Verdünnungen im Bereich $4-9 \log_{10}$ Zellen jeder einzelnen Bifidobakterienspezies, repräsentiert durch ihre Referenzstämme (**Tab. 2.7**), zugegeben. Die Zellkonzentration wurde mikroskopisch (400fache Vergrößerung, Nikon, Düsseldorf) durch Auszählen der Zellen mit der Thoma-Zeiss-Zählkammer (Kammertiefe: 0,01 mm, kleines Quadrat: $0,0025 \text{ mm}^2$) bestimmt. In Doppelbestimmung wurden je vier Kleinquadrate ausgezählt, wobei der Mittelwert für die Berechnung der Zellzahl je ml wie folgt einbezogen wurde: $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnung} \times 2,5 \times 10^6$. Die bakterielle DNA aus den Fäzesproben mit den zugefügten Zellen wurde wie im **Kap. 2.5** beschrieben extrahiert. Die

durch die entwickelten qPCR-Verfahren ermittelte Anzahl an *groEL*-Genkopien wurde dann mit der Zellzahl, die durch mikroskopisches Auszählen der Zellen in der Thoma-Zeiss-Zählkammer vor der Zugabe zu den Fäzesproben bestimmt wurde, verglichen.

2.9 Nachweis lebender Zellen des probiotischen Stammes CNCM I-3446 in Fäzes

Bisher erfolgte die molekulare Überwachung von CNCM I-3446 nach Einnahme entsprechender Nahrungsprodukte meist indirekt über die Amplifikation von Bereichen des 16S rRNA- oder *tuf*-Gens mit gattungs- (Satokari *et al.*, 2001b) oder speziesspezifischen Primern (Malinen *et al.*, 2002; Solano-Aguilar *et al.*, 2008). In dieser Arbeit erfolgte eine schnelle molekulare Identifizierung von CNCM I-3446 über den Nachweis eines stammspezifischen Transposase-Gens anstelle der oben genannten ubiquitär verbreiteten Gene.

Mittels Ausplattieren unterschiedlicher Verdünnungsstufen von Fäzesproben auf selektivem Agar und anschließender stammspezifischer PCR wurde eine Aussage über die Überlebensfähigkeit des probiotischen Stammes nach der Darmpassage getroffen (Protokoll durch Nestec Ltd, Nestlé Research Center gestellt). Wie oben beschrieben, wurden durch das klinische Personal 0,5 g frische Fäzes und 0,5 ml Ringerlösung mit Glycerin (10%) vermischt und bis zur Analyse der Proben bei -80 °C gelagert. Es wurden 0,1 g der fixierten Fäzesprobe in 9,9 ml Ringerlösung (**Anhang Tab. A2**) verdünnt (entspricht einer Verdünnung von 2×10^{-2}). Die Verdünnungen 2×10^{-2} , 2×10^{-4} und 2×10^{-6} wurden auf Tomatensaft-Agar (**Anhang Tab. A8**), der das Wachstum von Bifidobakterien begünstigt, ausplattiert. Die Agar-Platten wurden für 48 h in einem Anaerobentopf mit einem Beutel AnaeroGen (Oxoid, Cambridge, UK) zur Herstellung einer anaeroben Atmosphäre aus Stickstoff und Kohlendioxid bei 37 °C inkubiert. Alle Bakterienkolonien wurden mittels steriler Wattestäbchen abgenommen und zusammen in 10 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung (**Anhang Tab. A9**) suspendiert. Nach Zentrifugation bei $5000 \times g$ und 4 °C für 3 min wurde das Pellet in 1 ml 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung aufgenommen. Das Zellmaterial wurde in einem 2-ml Reaktionsgefäß mit 0,8 g sterilen Zirkonia/Silika-Kügelchen (0,1 mm Durchmesser; Roth, Karlsruhe) in einem FastprepTM FP120 Gerät (Thermo Electron Corporation, Waltham,

MA, USA) für 1 min bei der Stärke 6,0 aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 10 min wurden 400 μl vom Überstand, der die bakterielle DNA enthielt, abgenommen. Die stammspezifische PCR wurde sofort im Anschluss an die DNA-Extraktion durchgeführt, um eine durch den Zellaufschluss begünstigte hydrolytische und enzymatische Degradation der DNA vor der Analyse zu verhindern. Ein PCR-Reaktionsansatz von 25 μl enthielt 1 \times AmpliTaq Gold Puffer (Life Technologies, Darmstadt), 50 μM von jedem dNTP (Invitex, Berlin), 0,4 μM von jedem Primer (BB-12F 5'-GAG CTG ATC GAC GAC CTG AC-3' und BB-12R 5'-CCG AGA AAA TCT GGG ATG AG-3'), 1,25 U AmpliTaq Gold Polymerase (Life Technologies, Darmstadt) und 1 μl Zellextrakt. Als Positiv-Kontrolle wurden 100 ng/ μl DNA von *B. animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446 eingesetzt. Die Reaktionen wurden in einem PCR-Thermocycler (Thermo Hybaid MultiBlock System, Ulm) mit folgendem Temperaturprotokoll durchgeführt: 94 °C für 5 min, 30 Zyklen mit 94 °C für 30 s, 60 °C für 30 s, 72 °C für 30 s und ein Zyklus mit 72 °C für 5 min. Da die in der PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer ein stammspezifisches Transposase-Gen nachweisen, wurde ein PCR-Produkt nur in Anwesenheit des probiotischen Stammes erhalten. Die Größe des Amplifikates von 398 bp wurde in einem 1,5%igen Agarosegel (Serva, Heidelberg) in 1 \times TAE-Puffer (**Anhang Tab. A6**) nach Ethidiumbromidfärbung und Visualisierung unter UV-Licht nachgewiesen. Wurde ein spezifisches PCR-Produkt mit dem Zellmaterial der Verdünnung 2×10^{-6} erhalten, wurde die Verdünnung von 2×10^{-8} weiter untersucht.

2.10 Trockenmassebestimmung

Mindestens 20 mg der homogenisierten Fäzesprobe wurden auf einer Feinwaage (205SM-DR Precisa, Pescale; Bisingen) eingewogen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend lyophilisiert (Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4; Christ, Osterode; Vakuumpumpe P8Z, Ilmvac, Ilmenau). Die Rückwaage des Lyophilisats wurde prozentual zur Einwaagemenge gesetzt.

2.11 Bestimmung fäkaler Immunmarker

2.11.1 Sekretorisches Immunglobulin A

Die Gesamt-sekretorische Immunglobulin A-Konzentration (sIgA) in Fäzes wurde mittels dem IMMUNO-TEK Human IgA ELISA Kit (Zeptometrix, Buffalo, NY, USA) gemäß den Herstellerangaben in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Spectra rainbow, SLT Labinstruments, Salzburg, Österreich) gemessen. Die Bestimmungsgrenze betrug 7,8 ng/ml.

2.11.2 α_1 -Antitrypsin

Fäkales α_1 -Antitrypsin (AAT) wurde mit dem AAT ELISA Kit (Immundiagnostik, Bensheim) gemäß den Herstellerangaben in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Spectra rainbow, SLT Labinstruments, Salzburg, Österreich) gemessen. Die Bestimmungsgrenze betrug 10 ng/ml.

2.11.3 Lösliche Gesamtproteine

Die Konzentrationen der fäkalen Immunmarker IgA und AAT wurden schließlich auf die Konzentration löslicher Gesamtproteine in Fäzes normalisiert. Diese wurde mit dem Micro BCATM Protein Verfahren Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gemäß den Herstellerangaben in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Spectra rainbow, SLT Labinstruments, Salzburg, Österreich) gemessen. Die Bestimmungsgrenze betrug 2 μ g/ml.

2.12 Statistik

Die statistische Auswertung folgender Untersuchungen wurde mit GraphPad Prism Version 5,0 (San Diego, CA, USA) durchgeführt:

- Vergleich der Ergebnisse der entwickelten qPCR-Verfahren mit denen der Thoma-Zeiss-Zählkammer (Einfaktorielle Varianzanalyse, Korrektur des Signifikanzniveaus nach Bonferroni für Mehrfachvergleiche; $\alpha = 0,05$)
- Gleichverteilung der Neugeborenen auf die drei Studiengruppen hinsichtlich der Randomisierungsparameter (Chi-Quadrat-Test)

Die statistische Auswertung der Daten, die bei der klinischen Studie erhoben wurden, erfolgte durch die Biostatistikerin Aude Tavenard, MBIostat, (Nestec Ltd, Nestlé Research Center). Die entblindeten Daten blieben bei der Firma.

Primäres Ziel der Studie war es, die Besiedlung mit den zu untersuchenden Bakterien zwischen den Anfangsmilchgruppen und der gestillten Gruppe zu untersuchen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass im Vergleich zur Muttermilch die Anfangsmilch mit Synbiotikum-Supplementation eine stärkere Ähnlichkeit in der Besiedlung hervorruft als die Anfangsmilch ohne Supplement. Sekundäres Ziel der Studie war es, zu bewerten, ob anthropometrische Daten, Verträglichkeit der Testprodukte, Gesundheitszustand, fäkaler pH-Wert und fäkale Immunmarker in den Anfangsmilchgruppen mit der Muttermilchgruppe vergleichbar waren. Weiterhin sollte die Anwesenheit lebender Zellen des probiotischen Stammes CNCM I-3446 in den Fäzesproben der Studiengruppen untersucht werden. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte daher durch Vergleiche folgender Studiengruppen: Kontroll-Anfangsmilch- (KON-) vs. Muttermilchgruppe (REF-Gruppe) und Synbiotikum-Anfangsmilch- (SYN-) vs. Muttermilchgruppe (REF-Gruppe).

Die anthropometrischen Daten wurden mit dem WHO-Software-Programm (<http://www.who.int/childgrowth/standards/en>) in standardisierte Werte (z-Werte) transformiert. Dabei wurden sowohl das Geschlecht als auch die Daten zum Zeitpunkt der Geburt berücksichtigt. Die z-Werte wurden schließlich mit den Wachstumsstandards der WHO verglichen. Die Vergleiche KON- vs. REF-Gruppe und SYN- vs. REF-Gruppe wurden mittels Varianzanalyse und anschließender Korrektur des Signifikanzniveaus nach Dunnett durchgeführt ($\alpha = 0,05$).

Stuhlcharakteristik (Farbe, Konsistenz und Geruch), Blähungen, Regurgitation (flüssiges Aufstoßen/Speien) und Verhalten (unruhig, schreien) wurden hinsichtlich der Häufigkeit sowie ihrer einzelnen Kategorien zwischen den Studiengruppen bewertet. Die Vergleiche der Anfangsmilchgruppen mit der REF-Gruppe wurden mit logistischer Regressionsanalyse für jede Kategorie durchgeführt. Die Häufigkeiten der Defäkation, von Erbrechen und Darmkoliken pro Kind und Tag wurden mittels Poisson-Regressionsanalyse

unter den Gruppen verglichen. Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni für Mehrfachvergleiche korrigiert ($\alpha = 0,025$).

(Schwerwiegende) unerwünschte Ereignisse wurden entsprechend der bevorzugten Terminologie sowie der Systemorganklassen nach WHO ART (WHO *Adverse Reactions Terminology*) pro Kind festgehalten und überwacht. Für den Vergleich der Inzidenzen (schwerwiegender) unerwünschter Ereignisse zwischen den Anfangsmilchgruppen und der REF-Gruppe wurde das Odds-Verhältnis berechnet. Das Signifikanzniveau wurde für diese Mehrfachvergleiche nicht korrigiert.

Die pH-Werte der Fäzesproben zu Beginn der Studie sowie 6 W und 3 M nach Geburt des Kindes wurden im Gruppenvergleich mittels logistischer Regressionsanalyse (95%-Konfidenzintervall) ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde nach Dunnett für Mehrfachvergleiche korrigiert ($\alpha = 0,05$). Folgende Kennzeichnungen zur Charakterisierung der Signifikanzstärke werden in **Abb. 3.2** verwendet:

*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

Eine zu gestillten Kindern analoge Besiedlung des Gastrointestinaltrakts hinsichtlich der Gesamtbakterienzahl, Bacteroidetes, *Bifidobacterium*, der *C. leptum*-Gruppe, Enterobacteriaceae, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* und der untersuchten Bifidobaktérienspezies in Kindern aus den Anfangsmilchgruppen wurde anhand von Äquivalenztests aufgezeigt, wenn die Differenz der Zellzahlen zwischen den Gruppen die im Studienprotokoll vordefinierte Äquivalenzdifferenz Δ nicht überschritten (**Tab. 2.9**): $|\text{REF} - \text{KON}| < \Delta$ oder $|\text{REF} - \text{SYN}| < \Delta$. Für *C. difficile* und *S. epidermidis* wurden keine Äquivalenztests durchgeführt, da beide Bakteriengruppen erst während der Studie in die Analyse aufgenommen wurden und damit keine festgesetzten Äquivalenzdifferenzen im Vorfeld existierten.

Tabelle 2.9. Vordefinierte Äquivalenzdifferenz Δ für die untersuchten Bakterien

Bakterien	Δ (\log_{10} Zellen/g Fäzes)
Gesamtbakterien	0,5
Bacteroidetes	1
<i>Bifidobacterium</i>	0,5
<i>C. leptum</i> -Gruppe	1
Enterobacteriaceae	0,5
<i>Lactobacillus</i>	1
<i>Staphylococcus</i>	1
Bifidobakterienspezies	0,5

Bestand zwischen den Anfangsmilchgruppen und der REF-Gruppe keine Äquivalenz in der Besiedlung eines Bakteriums, aber $|\text{REF} - \text{SYN}| < |\text{REF} - \text{KON}|$, konnte geschlussfolgert werden, dass eine Tendenz zur Analogie bestand, die auf das supplementierte Synbiotikum zurückzuführen war. Die Nullhypothese H_0 war: Es gibt keine Äquivalenz bzw. Tendenz zur Äquivalenz. Die Arbeitshypothese H_1 war: Es gibt eine Äquivalenz bzw. Tendenz zur Äquivalenz. Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni für Mehrfachvergleiche korrigiert ($\alpha = 0,0036$ für die Gesamtbakterien/ausgewählten Taxa ohne *C. difficile* und *S. epidermidis*; $\alpha = 0,025$ für die Bifidobakterienspezies).

Die Zellzahlen der Bakterien zu Beginn der Studie wurden zwischen den Studiengruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummen-Test verglichen, um eine Differenz bereits zu Studienanfang ausschließen zu können. Die berechnete Differenz zwischen zwei Gruppen basierte auf der Differenz von \log_{10} transformierten Mittelwerten mit einem 97,50%-Konfidenzintervall. Das Signifikanzniveau wurde nach Bonferroni für Mehrfachvergleiche korrigiert ($\alpha = 0,025$). Für den Gruppenvergleich der Zellzahlen von Bakterien wurden die Werte aus den Zeitpunkten 6 W und 3 M für ein Kind folgendermaßen arithmetisch gemittelt: (i) Wenn beide Messungen vorlagen und bestimmbar waren, wurde der Mittelwert berechnet. (ii) Wenn beide Messungen vorlagen, jedoch nur eine von beiden bestimmbar war, wurde die nicht bestimmbar mit „0“ bewertet. Der aus diesen beiden Messungen resultierende Mittelwert wurde mit der mittleren Bestimmungsgrenze verglichen. Lag der Mittelwert über der Bestimmungsgrenze blieb er unverändert. Lag der Mittelwert unter der Bestimmungsgrenze, wurde er mit „0“ bewertet. (iii) Wenn nur eine

Messung vorlag, wurde dieser Wert genutzt sowie er über der Bestimmungsgrenze lag, andernfalls wurde er mit „0“ bewertet.

Für die statistische Analyse der gemittelten Werte aus den Zeitpunkten 6 W und 3 M wurde ein generalisiertes lineares Modell mit einer Tweedie-Verteilung angewandt. Bei Problemen mit der Angleichung der Werte wurde eine Quasi-Poisson-Verteilung angenommen. Die berechnete Differenz zwischen zwei Gruppen basierte auf der Differenz von \log_{10} transformierten Mittelwerten mit einem 99,64%-(Gesamtbakterien/ausgewählte Taxa ohne *S. epidermidis*, *C. difficile*) bzw. 97,50%-Konfidenzintervall (Bifidobakterienspezies). Folgende Kennzeichnungen werden in den Abbildungen verwendet, um die Signifikanzstärke auszudrücken: *, $p < 0,025$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,0005$ (Bifidobakterienspezies); *, $p < 0,0036$; **, $p < 0,0007$; ***, $p < 0,00007$ (Gesamtbakterien/ausgewählte Taxa).

Der Nachweis lebender Zellen des probiotischen Stammes CNCM I-3446 in Fäzesproben der Zeitpunkte < 2 W, 6 W und 3 M wurde zwischen den Gruppen mit logistischer Regressionsanalyse (95%-Konfidenzintervall) verglichen. Für diese Mehrfachvergleiche wurde das Signifikanzniveau entsprechend Bonferroni korrigiert ($\alpha = 0,025$).

3 ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung und Validierung quantitativer Real-Time PCR-Verfahren zur Quantifizierung von Bifidobakterienspezies aus humanen Fäzes

Die molekulare Identifizierung sowie Quantifizierung von Bifidobakterien auf Speziesebene erfolgte bislang hauptsächlich über das 16S rRNA kodierende Gen (Matsuki *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004c; Youn *et al.*, 2008). Jedoch weisen Bifidobakterienspezies eine hohe Sequenzidentität in diesem Gen auf (Ventura *et al.*, 2006). Daher wurden in dieser Arbeit SYBR Green I-basierende qPCR-Verfahren unter Verwendung des alternativen molekularen Markers *groEL* für eine quantitative Bewertung der Bifidobakteriendiversität in humanen Fäzesproben entwickelt. Die etablierten qPCR-Verfahren wurden zur Untersuchung des Einflusses eines Synbiotikums auf die Bifidobakterienpopulation im Darm von Neugeborenen angewandt.

3.1.1 Auswahl relevanter Bifidobakterienspezies

Häufig erfasste Bifidobakterienspezies der humanen intestinalen Mikrobiota sind *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum* und *B. pseudocatenulatum* (Biavati und Mattarelli 2006). *B. gallicum* wurde bisher nur selten detektiert (Biavati und Mattarelli 2006; Lauer 1990). *B. pseudolongum* und *B. thermophilum* wurden kürzlich in Fäzes von Erwachsenen bzw. eines Kindes nachgewiesen (Turroni *et al.*, 2009a; von Ah *et al.*, 2007), obwohl bislang angenommen wurde, dass beide Spezies nur tierischen Ursprungs sind (Biavati und Mattarelli 2006). Da der Stamm *B. animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446 im synbiotischen Produkt der hier vorgestellten klinischen Studie eingesetzt wurde, war es denkbar, dass *B. animalis* auch in den zu untersuchenden Fäzesproben vorkam. Die hier aufgeführten Bifidobakterienspezies wurden daher als relevant für die quantitative Erfassung der Bifidobakteriendiversität in humanen Fäzes angesehen.

Anhand von Mikrobiom-Analysen wurden aus humanen Fäzesproben 16S rRNA-Gensequenzen von Bifidobakterien-Phylotypen erhalten, die bisher noch nicht genauer

taxonomisch zugeordnet werden konnten (Turroni *et al.*, 2009b). Sie könnten neue Spezies repräsentieren, wodurch sich die Diversität humaner intestinaler Bifidobakterien weiter erhöhen würde. Erst kürzlich wurden zwei neue Bifidobakterienspezies aus menschlicher Fäzes isoliert: *B. stercoris* (Kim *et al.*, 2010) und *B. kashiwanohense* (Morita *et al.*, 2011). Diese konnten aber noch nicht in dieser Arbeit berücksichtigt werden, obwohl partielle *groEL*-Gensequenzen zur Verfügung stehen.

3.1.2 Spezifität der abgeleiteten Oligonukleotid-Primer

Die Eigenschaften und die Spezifität der abgeleiteten Primer jeder Bifidobakterienspezies wurden zunächst *in silico* mit OligoAnalyzer 3.1 von *Integrated DNA Technologies* (Owczarzy *et al.*, 2008) und dem BLAST Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990), bereitgestellt durch das *National Center of Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), untersucht. Jedes Primerpaar ist komplementär zur entsprechenden Sequenz der jeweiligen Bifidobakterienspezies und weist mindestens sechs Basenunterschiede zu den Sequenzen der übrigen untersuchten Bifidobakterienspezies auf (**Tab. 2.7**). Das abgeleitete Primerpaar für die Detektion von *B. thermophilum* zeigte auch eine Übereinstimmung zur *groEL*-Sequenz von *B. thermacidophilum*, das jedoch im humanen Verdauungstrakt nicht vorkommt (Biavati und Mattarelli 2006) und daher nicht relevant ist. Die Spezifität der abgeleiteten Primer wurde experimentell mittels qPCR an genomischer DNA von 28 Bifidobakterienstämmen und 10 weiteren Stämmen, die dominante intestinale Bakterienspezies repräsentieren, getestet (**Tab. 3.1**). Die Primer waren bei entsprechender *Annealing*-Temperatur (über Gradienten-PCR ermittelt) und Primerkonzentration für die jeweilige Bifidobakterienspezies spezifisch und führten zur Bildung eines PCR-Produktes der zu erwarteten Größe (**Tab. 2.6**). Die Anwendung der Primer bei den übrigen Stämmen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, führte nie zur Bildung eines PCR-Produktes. Dies wurde von folgenden Beobachtungen abgeleitet: (i) Die erhaltenen C_T -Werte für Stämme, die nicht erfasst werden sollten, waren vergleichbar mit den C_T -Werten der Negativkontrolle (Wasser). (ii) Weiterhin wurde kein Peak bei der spezifischen Schmelztemperatur der PCR-Produkte anhand der Schmelzkurvenanalyse festgestellt. Jedoch führte die Anwendung der Primer B_bif-f/B_bif-r mit genomischer DNA von *B. breve* DSM 20091 zu einem PCR-Produkt, das aber anhand der Schmelzkurvenanalyse klar als unspezifisch identifiziert und daher ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 3.1. Mittels qPCR getestete Bakterienstämme zur Untersuchung der Spezifität abgeleiteter Oligonukleotid-Primer

	Bifidobacterium-Stämme															
	qPCR-Ergebnisse mit folgenden Primern ^a :															
	B_ado-f/ B_ado-r	B_ang-f/ B_ang-r	B_ani-f/ B_ani-r	B_bif-f/ B_bif-r	B_bre-f/ B_bre-r	B_cat-f/ B_cat-r	B_den-f/ B_den-r	B_gal-f/ B_gal-r	B_lon-f/ B_lon-r	B_pcat-f/ B_pcat-r	B_plon-f/ B_plon-r	B_the-f/ B_the-r				
<i>B. adolescentis</i> DSM 20083 ^T , DSM 20086	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. angulatum</i> ATCC 27535 ^T , DSM 20225	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> DSM 20105	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> DSM 20104 ^T	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DSM 10140 ^T	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. bifidum</i> DSM 20456 ^T , DSM 20215, DSM 20239	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. breve</i> DSM 20213 ^T , DSM 20091	-	-	-	- ^b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. catenulatum</i> ATCC 27539 ^T , DSM 20224	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. dentium</i> ATCC 27534 ^T , ATCC 27678, DSM 20084	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. gallium</i> DSM 20093 ^T	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> ssp. <i>longum</i> ATCC 15707 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. longum</i> ssp. <i>suis</i> DSM 20211 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i> ATCC 27919 ^T , DSM 20439	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i> ATCC 25526 ^T , DSM 20094	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> DSM 20092 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>B. thermophilum</i> DSM 20210 ^T , DSM 20209, DSM 20212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

^a Zusätzlich zu den in der Tabelle aufgeführten *Bifidobacterium*-Stämmen wurden folgende Bakterienstämme getestet, wobei keine PCR-Produkte erhalten wurden: *B. thetaiotaomicron* DSM 20791^T, *B. vulgatus* DSM 1447^T, *B. producta* DSM 2950^T, *C. histolyticum* DSM 2158^T, *E. coli* DSM 30083^T, *F. prausnitzii* DSM 17677, *L. actidophilus* DSM 20079^T, *L. gasseri* DSM 20243^T, *R. albus* DSM 20455^T und *R. gaurvreauii* DSM 19829^T.

^b Im Fall von *B. breve* DSM 20091 wurde ein unspezifisches PCR-Produkt erhalten.

+, Spezifisches PCR-Produkt; -, Kein PCR-Produkt

3.1.3 Linearitäten der Kalibriergeraden und PCR-Effizienzen

Für alle untersuchten Bifidobakterienspezies wurden zur Erstellung einer Kalibriergerade 10-fach serielle Verdünnungen der Quantifizierungsstandards (PCR-Produkte mit der spezifischen partiellen *groEL*-Gensequenz) genutzt. Für alle Spezies waren die Kalibriergeraden im Bereich von mindestens 10 bis 100000 *groEL*-Genkopien pro PCR-Ansatz (entsprechen 6-10 log₁₀ Zellen/g Fäzes FM) linear ($R^2 > 0,99$). Ausnahmen stellten *B. angulatum* und *B. pseudolongum* dar, für die die Kalibriergerade erst ab 100 *groEL*-Genkopien pro PCR-Ansatz linear war. Die PCR-Effizienz (E) wurde über den Anstieg der Kalibriergeraden wie folgt berechnet: $E = 10^{(-1/\text{Anstieg})} - 1$ (z. B. E = 1 oder 100%). Für *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum* und *B. pseudocatenulatum* betrug E mindestens 90%. Für *B. angulatum*, *B. longum*, *B. pseudolongum* und *B. thermophilum* war E mindestens 85%.

3.1.4 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der entwickelten qPCR-Verfahren wurde in zwei unabhängigen qPCR-Läufen mit bakterieller DNA aus je drei Fäzesproben von Erwachsenen bestimmt. Vor der DNA-Extraktion wurden die Referenzstämme (**Tab. 2.7**) in unterschiedlich hoher Zellzahl zu den Fäzesproben einzeln zugefügt (*Spiking*-Experimente, **Kap. 2.8**). Die resultierenden Variationskoeffizienten der qPCR-Ergebnisse, basierend auf den *groEL*-Genkopien, waren kleiner als 10% und drücken damit eine hohe Reproduzierbarkeit aller entwickelten qPCR-Verfahren aus.

3.1.5 Thoma-Zeiss-Zählkammer als Referenzmethode

Die Bestimmung der Zellzahl mittels der Thoma-Zeiss-Zählkammer wurde als adäquate Referenzmethode für die entwickelten qPCR-Verfahren angesehen, da mit beiden Methoden sowohl lebende als auch tote Zellen erfasst werden. Die Referenzstämme von sechs Bifidobakterienspezies (*B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. breve*, *B. pseudolongum* und *B. thermophilum*) wurden einzeln zu Fäzesproben von Erwachsenen zugefügt (*Spiking*-Experimente, **Kap. 2.8**). Die durch die entwickelten qPCR-Verfahren ermittelte Anzahl an *groEL*-Genkopien wurde mit der Zellzahl verglichen, die durch mikroskopisches Auszählen der Zellen vor der Zugabe zu den Fäzesproben bestimmt

wurde. Die Wiederfindung für *groEL*-Genkopien wurde sowohl durch den Verlust von Kopien während der DNA-Extraktion als auch durch die Effizienz der Zellyse beeinflusst. Unabhängig von der eingesetzten Spezies, betrug die Wiederfindung für *groEL*-Genkopien in den Fäzesproben mit 5-9 \log_{10} zugefügten Bifidobakterienzellen je g Fäzes 45% bzw. 48% (**Abb. 3.1 A, B**); der Verlust belief sich auf einen Faktor von etwa 2. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Bestimmung der Zellzahl einer Bifidobakterienspezies in einer Fäzesprobe über die Zahl der *groEL*-Genkopien nicht nur reproduzierbar sondern auch mit der durch Mikroskopie bestimmten vergleichbar war. Weiterhin konnte geschlussfolgert werden, dass die Lyse der schwer aufzuschließenden grampositiven Bifidobakterien effektiv war.

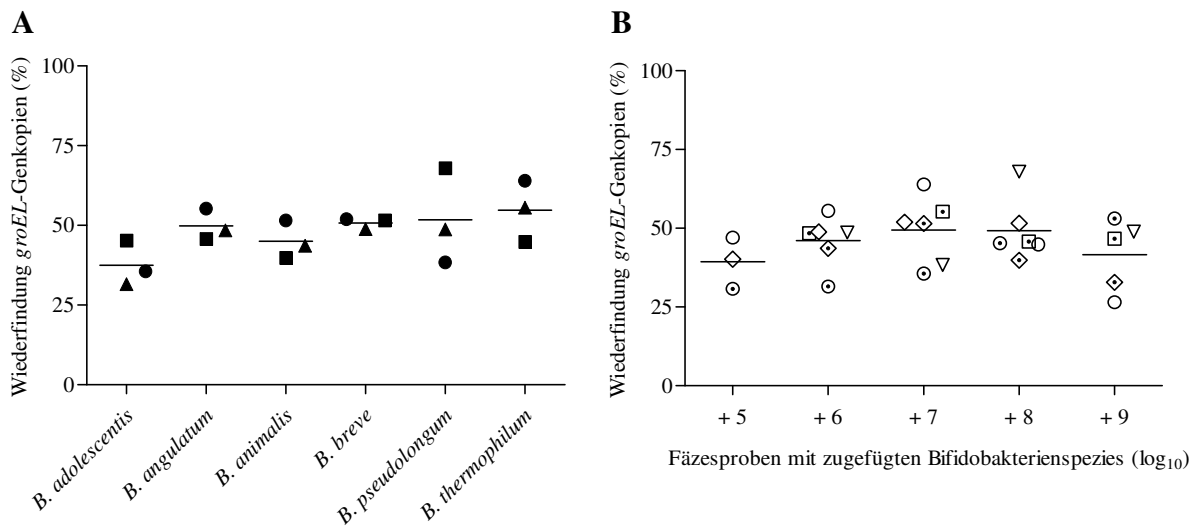


Abbildung 3.1. Vergleich der durch die entwickelten qPCR-Verfahren bestimmten *groEL*-Genkopien mit den Zellzahlen, die durch mikroskopisches Auszählen mittels Thoma-Zeiss-Zählkammer als Referenzmethode ermittelt wurden. Dafür wurde eine bekannte Anzahl von Bifidobakterienzellen zu Fäzesproben von Erwachsenen hinzugefügt (*Spiking*). **(A)** *Spiking* erfolgte mit 6 \log_{10} (▲), 7 \log_{10} (●) und 8 \log_{10} (■) Zellen von sechs *Bifidobacterium*-Spezies. **(B)** *Spiking* erfolgte mit 5 \log_{10} ($n = 3$), 6 \log_{10} ($n = 6$), 7 \log_{10} ($n = 6$), 8 \log_{10} ($n = 6$) und 9 \log_{10} Zellen ($n = 5$) von *B. adolescentis* (◐), *B. angulatum* (◑), *B. animalis* (◒), *B. breve* (◓), *B. pseudolongum* (◔) und *B. thermophilum* (◕). Werte sind als MW dargestellt. Die Unterschiede der MW waren nicht signifikant ($\alpha = 0,05$). Die Wiederfindung für *groEL*-Genkopien war (A) 48% \pm 6 und (B) 45% \pm 6 (MW \pm SD).

3.1.6 Bestimmungsgrenzen

Um die niedrigste Anzahl an *groEL*-Genkopien bzw. Zellen in Fäzesproben zu ermitteln, die mit den entwickelten qPCR-Verfahren noch quantifiziert werden konnte, wurde der Referenzstamm jeder zu untersuchenden Bifidobakterienspezies (**Tab. 2.7**) in bekannter Konzentration einzeln zu Fäzesproben von Erwachsenen hinzugefügt (*Spiking*). Die Bestimmungsgrenzen der qPCR-Verfahren für *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum* und *B. thermophilum* betragen 1 *groEL*-Genkopie pro PCR-Ansatz (entsprechen $5 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes FM) bzw. 10 *groEL*-Genkopien pro PCR-Ansatz ($6 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes FM) für *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. gallicum* und *B. pseudolongum*.

Die ermittelten Bestimmungsgrenzen stimmten mit den Quantifizierungsstandards der niedrigsten noch zu quantifizierenden Konzentration meist überein, waren aber höchstens um 1 \log_{10} niedriger. Diese Differenz kann auf eine durch mikroskopisches Auszählen überschätzte Zellzahl zurückzuführen sein. Die z. T. mehrfach verzweigte Zellmorphologie von Bifidobakterien (z. B. *B. angulatum*) oder sehr langen Stäbchen wie bei *B. dentium* könnten zu einer überhöhten Zellzahl beigetragen haben. Auch könnten Zellen, die sich nicht offensichtlich in Teilung befanden und somit bereits mehr als ein Genom mit folglich mehr als einer *groEL*-Genkopie besaßen, ebenfalls zu einer niedrigeren Bestimmungsgrenze geführt haben.

3.1.7 DNA-Extraktion

3.1.7.1 Ausschluss von PCR-Inhibitoren

Fäzes enthalten zahlreiche PCR-Inhibitoren wie z. B. Harnstoff, Hämoglobin und Bilirubin. Um einen hemmenden Einfluss solcher Substanzen auf die qPCR auszuschließen, musste sichergestellt werden, dass diese während der bakteriellen DNA-Extraktion (**Kap. 2.5**) entfernt wurden. 10-fach serielle Verdünnungen der DNA-Extrakte aus Fäzesproben von je zwei Kindern (K-a, K-b) und Erwachsenen (E-a, E-b) wurden mit dem entwickelten qPCR-Verfahren für *B. longum* in den Konzentrationen 0 bis $-3 \log_{10}$ analysiert. Da die berechneten Zellzahlen (*groEL*-Genkopien/g Fäzes FM) für die verdünnten und unverdünnten Proben nahezu gleich waren ($10,09 \pm 0,03$ in K-a; $9,86 \pm 0,12$ in K-b;

$9,17 \pm 0,02$ in E-a und $9,28 \pm 0,05$ in E-b [MW \pm SD \log_{10} , $n = 4$], wurde daraus geschlossen, dass PCR-Inhibitoren die PCR nicht beeinflussten.

3.1.7.2 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktion wurde anhand dreimal extrahierter bakterieller DNA aus Fäzesproben von zwei Kindern und einem Erwachsenen durch die Quantifizierung von *B. breve*, *B. longum* und der Gattung *Bifidobacterium* bestimmt. Die auf *groEL*-Genkopien basierenden Variationskoeffizienten betrugen weniger als 23%, was die gute Reproduzierbarkeit der DNA-Extraktionsmethode bestätigte.

3.1.7.3 Anpassung der Fäzesmenge

Einige Fäzesproben von den Neugeborenen wogen weniger als die für die Extraktion bakterieller DNA laut Protokoll einzuwiegende Menge von 220 mg (**Kap. 2.5**). Daher wurde DNA sowohl aus 220 mg als auch aus 110 mg und 55 mg Fäzes von je drei Kindern extrahiert. Die Proben wurden mit den in **Tab. 2.2** aufgezeigten qPCR-Bedingungen für vier Bakteriengruppen sowie für die Gesamtbakterien quantifiziert (**Tab. 3.2**). Die Variationskoeffizienten der berechneten Zellzahlen (bakterielle Genome/g Fäzes FM), die aus den unterschiedlichen Fäzesmengen erhalten wurden, betrugen zwischen 1,65% und 57,59% (**Tab. 3.2**) und überstiegen damit teilweise den Variationskoeffizienten der qPCR-Ergebnisse zwischen verschiedenen DNA-Extrakten von etwa 23% (**Kap. 3.1.7.2**). Da sich die Zellzahlen jedoch höchstens um einen Faktor von ungefähr 2 unterschieden und eine möglichst hohe Anzahl an Fäzesproben in die Studie eingeschlossen werden sollte, wurden Proben von weniger als 220 mg mit der zur Verfügung stehenden Höchstmenge, mindestens aber 30 mg, weiter berücksichtigt.

Tabelle 3.2. Einfluss von geringeren Fäzesmengen in der DNA-Extraktion auf die qPCR-Ergebnisse

Probe/ Fäzesmenge	Log ₁₀ Zellen/g Fäzes FM (V _K)									
	Bacteroidetes		<i>Bifidobacterium</i>		Entero- bacteriaceae		<i>Staphylo- coccus</i>		Gesamtbakterien	
K-1	110 mg	7,09	(46,14%)	10,97	(21,64%)	10,41	(26,22%)	–	n. b.	
	220 mg	6,80		11,10		10,58		–	n. b.	
K-2	110 mg	5,41	(57,59%)	–		10,00	(35,77%)	6,00	(1,76%)	n. b.
	220 mg	5,79		5,72		9,78		5,99		n. b.
K-3	110 mg	9,25	(56,81%)	10,64	(36,94%)	10,51	(35,98%)	7,28	(1,65%)	n. b.
	220 mg	8,88		10,41		10,28		7,27		n. b.
K-4	55 mg	5,76		–		–		–		11,39
	220 mg	5,62	(22,17%)	5,31		–		5,85		11,54 (23,54%)
K-5	55 mg	6,52		–		11,11		–		11,78
	220 mg	6,15	(56,50%)	–		10,82	(44,49%)	–		11,62 (25,46%)
K-6	55 mg	9,08		10,23		10,21		–		11,20
	220 mg	9,44	(54,68%)	10,54	(48,77%)	10,44	(36,38%)	–		11,47 (42,07%)

V_K, Variationskoeffizient

n. b., nicht bestimmt

–, nicht quantifiziert; Bestimmungsgrenzen (Zellen/g Fäzes FM) betragen 5 log₁₀ (*Bifidobacterium*, *Staphylococcus*) und 6 log₁₀ (Enterobacteriaceae)

3.2 Charakterisierung der Studienpopulation

Für die klinische Studie wurden 115 Neugeborene rekrutiert (*Intention-to-Treat*-Studienpopulation). Dreiundfünfzig Kinder verfehlten das Studienprotokoll, da sie entweder die Ein-/Ausschlusskriterien nicht erfüllten, die Studie frühzeitig beendeten, die Testprodukte an mehr als drei aufeinander folgenden Tagen nicht verzehrten oder während der Studie Antibiotika/Antimykotika bzw. Pro-/Präbiotika einnahmen. Die verbleibenden 62 Neugeborenen erfüllten die Vorgaben des Studienprotokolls (*Per-Protocol*-Studienpopulation) und wurden in dieser Arbeit ausschließlich betrachtet. Charakteristika dieser Studienpopulation sind in **Tab. 3.3** aufgeführt. Zwischen den Studiengruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Randomisierungsparameter.

Tabelle 3.3. Charakteristika der *Per-Protocol*-Studienpopulation

Randomisierungsparameter	Studiengruppe			<i>p</i> -Wert ^a
	Muttermilch, Referenz (REF) (<i>n</i> = 23)	Kontroll-Anfangsmilch (KON) (<i>n</i> = 18)	Synbiotikum-Anfangsmilch (SYN) (<i>n</i> = 21)	
Geschlecht				
Weiblich	6 (26,1%)	11 (61,1%)	9 (42,9%)	0,078
Männlich	17 (73,9%)	7 (38,9%)	12 (57,1%)	
Art der Entbindung				
Kaiserschnittgeburt	5 (21,7%)	6 (33,3%)	9 (42,9%)	0,324
Vaginale Geburt	18 (78,3%)	12 (66,7%)	12 (57,1%)	

^a Chi-Quadrat-Test, $\alpha = 0,05$
n, Anzahl der Kinder

3.3 Gesundheitliche Überwachung

3.3.1 Anthropometrische Entwicklung

Zu den Zeitpunkten 6 W und 3 M gab es zwischen den Kindern der Anfangsmilchgruppen und denen der Muttermilchgruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Körpergewichts, der Körpergröße und des Kopfumfanges ($p = 0,524-0,983$; n. s.).

3.3.2 Verträglichkeit der Testprodukte

Die ausgewählten Parameter zur Beurteilung der Verträglichkeit der Testprodukte wurden 6 W und 3 M nach Geburt des Kindes bestimmt. Die Häufigkeit der Defäkation pro Kind und Tag war zwischen den Anfangsmilchgruppen und der REF-Gruppe mit durchschnittlich ca. 3-mal (6 W) bzw. ca. 2-mal (3 M) vergleichbar ($p = 0,353-0,969$; n. s.). Für die Stuhlfarbe wurden vier Kategorien (braun, grün, gelb, andere Farbe) definiert. Die Fäzesproben von gestillten Kindern waren im Studienverlauf meistens gelblich (ca. 75%) oder grünlich (ca. 25%) und nur selten bräunlich. Kinder aus der KON-Gruppe hatten häufiger grünliche (ca. 50% [6 W], ca. 70% [3 M]) und seltener gelbliche Fäzes (ca. 50% [6 W], 30% [3 M]) als die gestillten Kinder ($p < 0,025$). Kinder, die das Synbiotikum erhielten, hatten mit 6 W im Vergleich zur REF-Gruppe weniger grünliche Fäzes (ca. 15%, $p < 0,025$). Die Konsistenz der Fäzes wurde in „hart“, „geformt“, „weich“, „breiig“ oder „wässrig“ eingeteilt. Gestillte Kinder hatten zu beiden Zeitpunkten ein ähnliches Vorkommen von geformten (ca. 20%), weichen (ca. 30%) oder breiigen Fäzes (ca. 50%). Dagegen zeigten die Fäzesproben aus den Anfangsmilchgruppen häufiger eine weiche (ca. 60-70%) und seltener eine breiige (ca. 2-20%) Konsistenz verglichen mit denen aus der REF-Gruppe ($p < 0,025$). Der Geruch der Fäzes wurde entweder als „normal“ oder als „ungewöhnlich“ bewertet. Während die Fäzes gestillter Kinder nach 6 W ausschließlich normal gerochen hat, gab es in den Anfangsmilchgruppen vereinzelt Fäzesproben, die ungewöhnlich rochen ($p < 0,025$). Jedoch wies eine Fäzesprobe aus der REF-Gruppe nach 3 M einen ungewöhnlichen Geruch auf, während die Fäzes der nicht gestillten Kinder normal rochen (KON- vs. REF-Gruppe, $p = 0,909$; n. s.; SYN- vs. REF-Gruppe, $p < 0,025$). Das Auftreten von Blähungen wurde mit „nie“, „manchmal“ oder „oft“ beurteilt. Die Mehrheit der gestillten Kinder litt während der Studie manchmal an Blähungen (ca. 68%).

Die verbleibenden gestillten Kinder hatten zu gleichen Anteilen entweder nie oder oft Blähungen. Kinder aus den Anfangsmilchgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede zur REF-Gruppe (0,084-0,804; n. s.). Abdominale krampfartige Kontraktionen (Darmkoliken) kamen in allen Studiengruppen gleich häufig vor (durchschnittlich 0-7 Ereignisse/Kind und Tag, $p = 0,101-0,594$; n. s.). Das Volumen der Regurgitation (flüssiges Aufstoßen/Speien) nach dem Füttern wurde folgendermaßen eingeteilt: nichts, wenig (5 ml), viel (5-25 ml) oder sehr viel (> 25 ml). Gestillte Kinder spuckten während der Studie meistens wenig (ca. 50%), nichts oder viel (je ca. 25%) aufgenommene Milch wieder aus. Nach 3 M spuckten mehr Kinder der Anfangsmilchgruppen „nichts“ aus als Kinder der REF-Gruppe (KON- vs. REF-Gruppe, $p < 0,025$; SYN- vs. REF-Gruppe, $p = 0,035$; n. s.). Entsprechend gab es weniger Kinder, die größere Volumina ausspuckten (KON- vs. REF-Gruppe, $p = 0,024$; SYN- vs. REF-Gruppe, $p = 0,001$). Kinder aus den Anfangsmilchgruppen erbrachen sich genauso häufig wie die der REF-Gruppe (durchschnittlich 0,1-5 Ereignisse/Kind und Tag; $p = 0,190-0,646$, n. s.). Unruhiges Verhalten eines Kindes wurde mit „nie“, „manchmal“ oder „oft“ beurteilt. Die Kinder aller Studiengruppen waren während der Studie meistens nie (ca. 75%) oder manchmal (ca. 25%) unruhig ($p = 0,092-1$; n. s.). Die Dauer des Schreiens wurde mit < 1 h, 1-3 h und > 3 h pro Tag festgehalten. Gestillte Kinder schrienen zu beiden Zeitpunkten meist < 1 h (ca. 70%) oder 1-3 h (30%). Nach 6 W verhielten sich gestillte und nicht gestillte Kinder ähnlich ($p = 0,030-1$; n. s.). Nach 3 M waren es im Vergleich zur REF-Gruppe signifikant weniger Kinder der SYN-Gruppe, die 1-3 h ($p = 0,015$) und mehr, die < 1 h ($p = 0,465$; n. s.) schrienen.

3.3.3 Gesundheitszustand

Über den Zeitraum der Studie wurden folgende unerwünschte Ereignisse entsprechend der WHO ART verzeichnet: (i) Nach bevorzugter Terminologie: Diarrhö, Ekzem, Gastroenteritis durch Rotavirus, Nasopharyngitis, Refluxösophagitis, Rhinitis, Säuglingskolik; (ii) Nach Systemorganklassen: gastrointestinale Erkrankungen, respiratorische/thorakale/mediastinale Erkrankungen, (Unter-) Hautgewebserkrankungen. Die Inzidenz unerwünschter Ereignisse war zwischen den Studiengruppen vergleichbar ($p = 0,496-0,950$; n. s.). Schwerwiegende unerwünschte Wirkungen traten nicht auf.

3.4 Fäkaler pH-Wert

Der pH-Wert der Fäzesproben wurde während der vorgesehenen Untersuchungen gemessen. Die Fäzesproben der Kinder aus den Anfangsmilchgruppen hatten zum Studienende mit $6,45 \pm 0,17$ (KON-Gruppe) und $6,07 \pm 0,20$ (SYN-Gruppe) einen signifikant höheren pH-Wert als die gestillten Kinder mit $5,29 \pm 0,12$ (MW \pm SEM; $p < 0,05$; **Abb. 3.2**). Der pH-Wert der Fäzesproben aus der SYN-Gruppe kommt dem der aus der REF-Gruppe näher als der aus der KON-Gruppe.

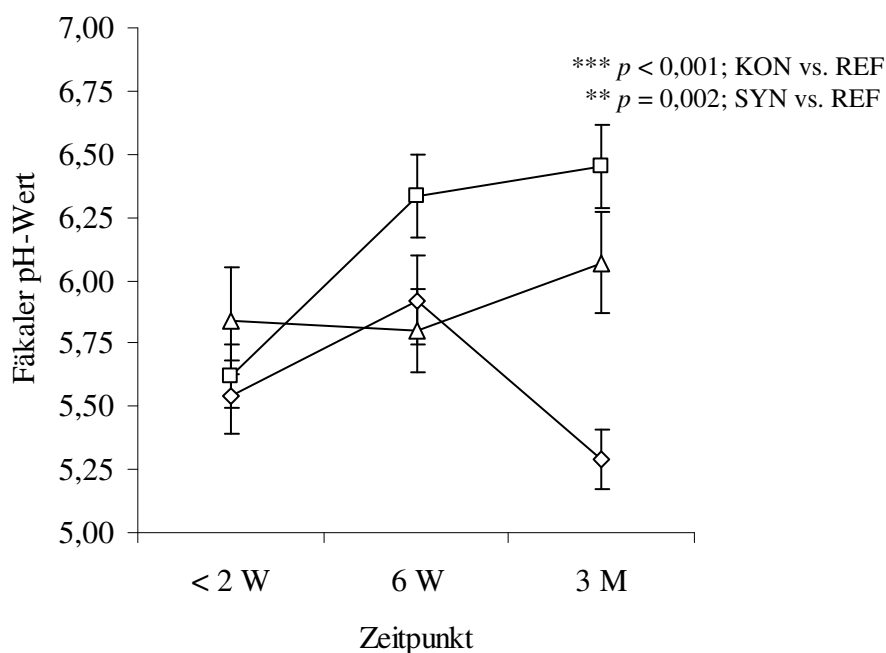


Abbildung 3.2. Fäkaler pH-Wert in den Studiengruppen. Die Zeitpunkte < 2 Wochen (< 2 W), 6 Wochen (6 W) und 3 Monate (3 M) stellen MW und SEM von 14, 22 und 20 gestillten Kindern (REF-Gruppe, ◇), 18, 17 und 16 Kindern aus der Kontroll-Anfangsmilchgruppe (KON-Gruppe, □) bzw. 16, 21 und 20 Kindern aus der Synbiotikum-Anfangsmilchgruppe (SYN-Gruppe, △) dar. $\alpha = 0,05$.

3.5 Profil der intestinalen Mikrobiota

Der Einfluss des Synbiotikums auf die intestinale Mikrobiota von Neugeborenen wurde über die Bestimmung der Gesamtzellzahl, acht ausgewählter Bakteriengruppen und zwölf Bifidobakterienspezies (**Tab. 2.2, Tab. 2.7**) in Fäzesproben durch qPCR untersucht. Die Proben wurden zu Beginn der Studie (< 2 W) sowie im Kindesalter von 6 W und 3 M genommen. Jedoch lag nicht von jedem Kind eine Fäzesprobe für alle drei Zeitpunkte vor. Fäzesproben, die zu wenig Material für die DNA-Extraktion (< 30 mg) und die Trockenmassebestimmung (< 20 mg) aufwiesen, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

In der statistischen Auswertung wurden nur Werte oberhalb der Bestimmungsgrenze berücksichtigt. Die Bestimmungsgrenzen für jedes qPCR-Verfahren wurden vom Quantifizierungsstandard mit der niedrigsten noch zu bestimmenden Konzentration abgeleitet; sie variierten zwischen 5-7 log₁₀ Zellen/g Fäzes TM (Gesamtakterien/ausgewählte Taxa, **Abb. 3.3**) bzw. zwischen 6-8 log₁₀ Zellen/g Fäzes TM (Bifidobakterienspezies, **Abb. 3.4**).

Die ermittelten Zellzahlen der Bakterienpopulationen wiesen zwischen den Studiengruppen zu Beginn der Studie keinen statistisch signifikanten Unterschied auf; nur *S. epidermidis* war signifikant unterschiedlich ($p = 0,018$). Um die statistische Bewertung der Daten zur bakteriellen Besiedlung auf eine breitere Grundlage zu stellen, wurden die Messwerte von 6 W und 3 M wie in **Kap. 2.12** dargelegt, gemittelt.

3.5.1 Gesamtbakterien und ausgewählte Taxa

Die zu den oben genannten Studienzeitpunkten in den Fäzesproben der Muttermilchgruppe und der Anfangsmilchgruppen erfassten Zellkonzentrationen von Bakteriengruppen sind in **Abb. 3.3** dargestellt. Die Prävalenzen dieser Bakterienpopulationen sind in **Tab. 3.4** aufgelistet.

In den Fäzesproben der Kinder aus allen drei Studiengruppen blieb die Gesamtbakterienzahl von etwa 11,0-11,5 log₁₀ Zellen/g TM über den betrachteten Zeitraum stabil; die Zellzahlen aus beiden Anfangsmilchgruppen waren zur REF-Gruppe äquivalent ($p = 0,001$ [SYN- vs. REF-Gruppe] und $p = 0,0001$ [KON- vs. REF-Gruppe];

Äquivalenzdifferenz $< 0,5 \log_{10}$ Zellen/g TM). In SYN- und KON-Gruppe überschritten die Zellzahlen von Bacteroidetes, *Bifidobacterium*, der *C. leptum*-Gruppe, Enterobacteriaceae und *Staphylococcus* die der REF-Gruppe um die vor der Studie definierte Äquivalenzdifferenz von 0,5 bzw. $1 \log_{10}$ Zellen/g TM (**Tab. 2.9**; $p = 0,006-0,665$; n. s.). Demnach erfolgte die Besiedlung des Gastrointestinaltrakts mit diesen Bakterienpopulationen bei den Kindern aus beiden Anfangsmilchgruppen nicht äquivalent zu der in den gestillten Kindern. Eine Tendenz zu einer analogen Besiedlung hin wurde durch den Zusatz mit dem Synbiotikum nicht erreicht ($p > 0,0036$; n. s.).

Die Zellzahlen von Bacteroidetes stiegen in allen Gruppen im Verlauf der Studie leicht an, v. a. in der KON-Gruppe (von $\sim 7,0$ auf $8,5 \log_{10}$ Zellen/g TM). Bereits innerhalb der ersten 6 W stiegen die Zellzahlen von *Bifidobacterium* um $1,5 \log_{10}$ Zellen/g TM in KON- und REF-Gruppe an, in der SYN-Gruppe sogar um $3,5 \log_{10}$ auf $11,5 \log_{10}$ Zellen/g TM. Die Konzentration an Bifidobakterien in der SYN-Gruppe überstieg deutlich die der KON- und REF-Gruppe. Alle Gruppen zeigten einen ähnlichen leicht ansteigenden Verlauf für die *C. leptum*-Gruppe von ca. $6,0$ auf $7,0 \log_{10}$ Zellen/g TM. Die Familie der Enterobacteriaceae blieb in allen Gruppen über den Zeitraum der Studie konstant hoch ($10,0-10,5 \log_{10}$ Zellen/g TM) mit Ausnahme der REF-Gruppe, in der die Zellzahlen nach 6 W auf $9,5 \log_{10}$ Zellen/g TM sanken. Zu Studienbeginn war *Lactobacillus* mit etwa $7,5-8,5 \log_{10}$ Zellen/g TM in allen Gruppen nachweisbar; während der Studie stieg *Lactobacillus* in der SYN- bzw. REF-Gruppe um $1,0-1,5 \log_{10}$ Zellen/g TM an. Der Äquivalenztest mit den Mitteln der Werte nach 6 W und 3 M ergab, dass die Besiedlung mit diesen Bakterien in SYN- und REF-Gruppe analog war ($p = 0,0019$; Äquivalenzdifferenz $< 1 \log_{10}$ Zellen/g TM). *Staphylococcus* blieb in allen Gruppen mit $7,0-8,0 \log_{10}$ Zellen/g TM weitgehend unverändert.

Erst im Verlauf dieser Studie wurde über die Quantifizierung der potenziell pathogenen *C. difficile* und *S. epidermidis* in den Gruppen entschieden. Daher existierten keine vordefinierten Äquivalenzdifferenzen, wodurch hinsichtlich dieser beiden Bakterienpopulationen keine Äquivalenztests durchgeführt werden konnten. *C. difficile* war erst nach 6 W mit ca. $7,0-8,5 \log_{10}$ Zellen/g TM in KON- und REF-Gruppe und $9,5-10,0 \log_{10}$ Zellen/g TM in der SYN-Gruppe detektierbar. In der REF-Gruppe betrug

die Zellzahlen von *S. epidermidis* nach 6 W und 3 M etwa 7,5-8,0 log₁₀ Zellen/g TM, in den Anfangsmilchgruppen hingegen nur ca. 6,5 log₁₀ Zellen/g TM. Da *S. epidermidis* ein potenziell pathogenes Bakterium darstellt, könnte man auf eine verbesserte Besiedlung in den Anfangsmilchgruppen schließen. Jedoch unterschieden sich die Zellzahlen von *S. epidermidis* bereits zu Studienbeginn zwischen beiden Anfangsmilchgruppen und der REF-Gruppe deutlich (9,0 vs. 7,5 log₁₀ Zellen/g TM; $p = 0,018$). Die Abnahme von *S. epidermidis* über den betrachteten Zeitraum war in den Studiengruppen etwa vergleichbar (1 log₁₀ in den Anfangsmilchgruppen vs. 1,5 log₁₀ Zellen/g TM in der REF-Gruppe).

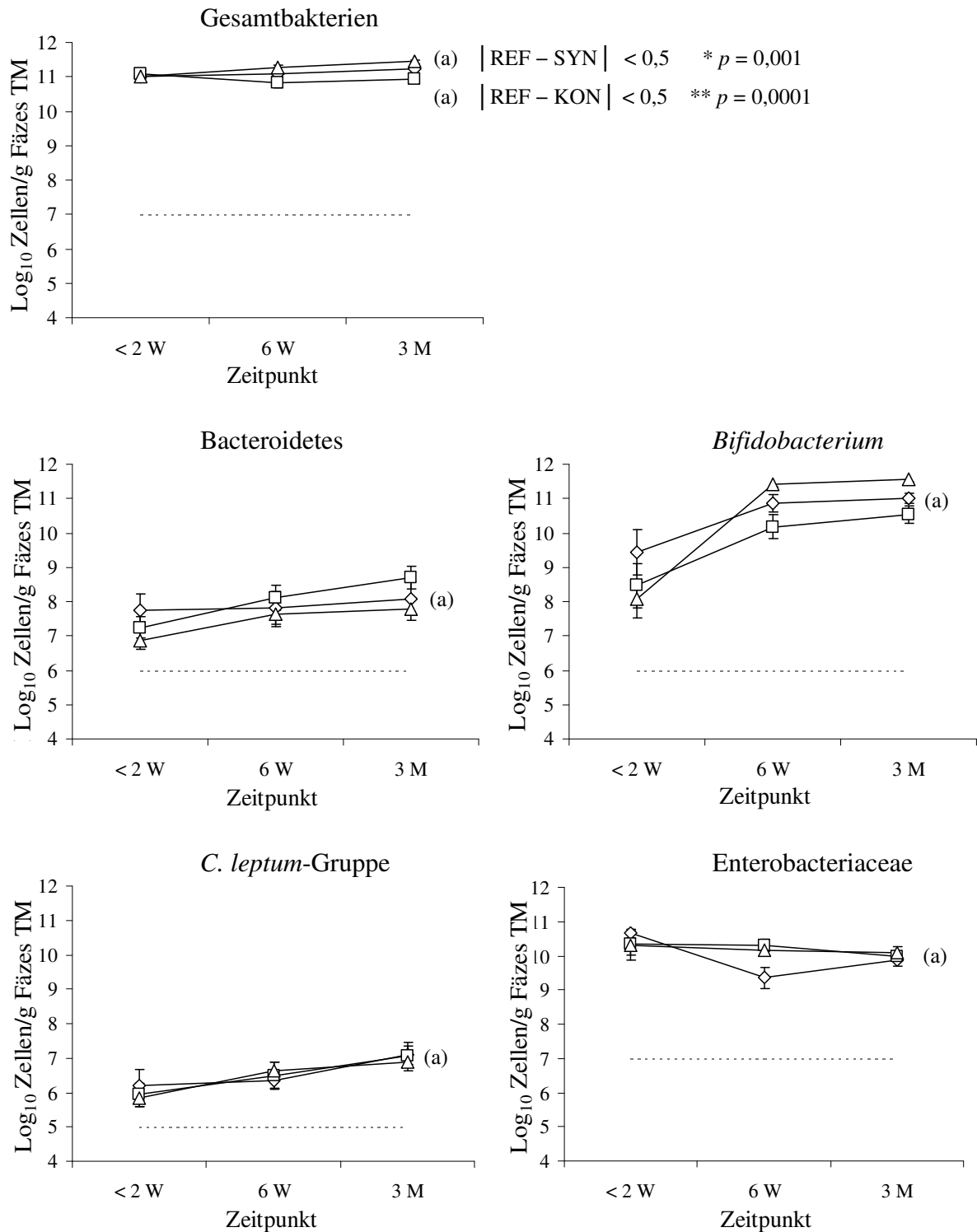


Abbildung 3.3. Fäkale Zellkonzentrationen der Gesamt Bakterien und ausgewählten Taxa in den Studiengruppen. Die Zeitpunkte < 2 Wochen (< 2 W), 6 Wochen (6 W) und 3 Monaten (3 M) stellen MW und SEM von 11, 21 und 19 gestillten Kindern (REF-Gruppe, -◇-), 18, 17 und 16 Kindern aus der Kontroll-Anfangsmilchgruppe (KON-Gruppe, -□-) bzw. 16, 20 und 20 Kindern aus der Synbiotikum-Anfangsmilchgruppe (SYN-Gruppe, -△-) dar. Gruppenvergleiche basieren auf dem Mittel der Werte von 6 W und 3 M: (a) Äquivalenztest, $\alpha = 0,0036$; (b) kein Äquivalenztest durchgeführt; Gestrichelte Linie, Bestimmungsgrenze

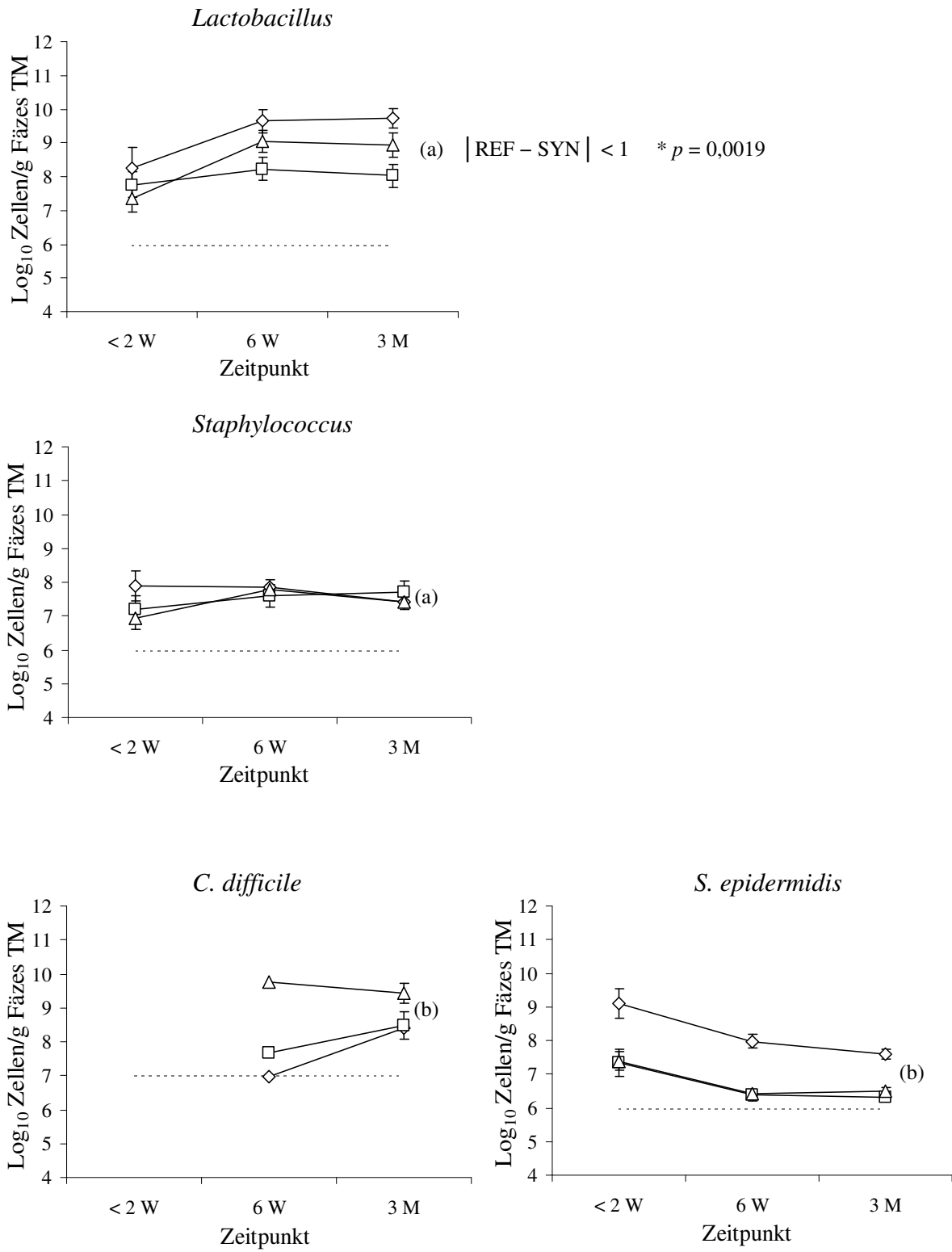


Abbildung 3.3. (Fortsetzung)

Die Prävalenz der Bakteriengruppen in den Fäzesproben aller Studiengruppen ist in **Tab. 3.4** aufgeführt. Bacteroidetes war im Studienverlauf in fast allen Fäzesproben der Anfangsmilchgruppen vertreten, wobei die Prävalenz dieser Bakterienpopulation in Fäzesproben der REF-Gruppe etwas geringer war (ca. 95-100% vs. 85-90%). Diese Beobachtung traf ebenso für die Enterobacteriaceae zu. Während *Bifidobacterium* bereits zu Beginn der Studie in nahezu allen Fäzesproben gestillter Kinder detektiert wurde (ca. 90%), waren es in der SYN-Gruppe etwas (ca. 80%) und in der KON-Gruppe deutlich weniger (ca. 60%) Proben. Trotz dieser Unterschiede zu Beginn der Intervention waren zu den späteren Zeitpunkten in fast allen Fäzesproben sowohl der Anfangsmilchgruppen als auch der REF-Gruppe Bifidobakterien nachzuweisen. Die *C. leptum*-Gruppe war in der REF-Gruppe über die gesamte Studiendauer in etwa der Hälfte der Fäzesproben vorhanden. Dagegen war ihre Prävalenz in den Anfangsmilchgruppen deutlich höher (etwa 80%). *Lactobacillus* war in drei Studiengruppen etwa gleich häufig vertreten (>90%). *Staphylococcus* war während der Studie in den gestillten Kindern etwas häufiger präsent als in den Anfangsmilchgruppen (ca. 85% vs. 70%). Am Ende der Studie zeichnete sich ein leicht erhöhtes Vorkommen von *C. difficile* in den Fäzesproben der Anfangsmilchgruppen ab (ca. 10-20% vs. 5% in der REF-Gruppe). Da *C. difficile* jedoch insgesamt in nur wenigen Fäzesproben nachgewiesen wurde, ist eine vergleichende Aussage zur Prävalenz wenig belastbar. Während nach 6 W in fast allen Fäzesproben gestillter Kinder *S. epidermidis* detektiert wurde, waren es in den Anfangsmilchgruppen deutlich weniger (ca. 95% vs. 65%).

Tabelle 3.4. Prävalenz der Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa in den Fäzesproben der Neugeborenen aus den Studiengruppen^a

Taxa/ Gesamtbakterien	Zeitpunkt	Studiengruppe		
		REF-Gruppe	KON-Gruppe	SYN-Gruppe
		$n_{(< 2 \text{ W})} = 11$ $n_{(6 \text{ W})} = 21$ $n_{(3 \text{ M})} = 19$	$n_{(< 2 \text{ W})} = 18$ $n_{(6 \text{ W})} = 17$ $n_{(3 \text{ M})} = 16$	$n_{(< 2 \text{ W})} = 16$ $n_{(6 \text{ W})} = 20$ $n_{(3 \text{ M})} = 20$
Gesamtbakterien	< 2 W	11 (100%)	18 (100%)	16 (100%)
	6 W	21 (100%)	17 (100%)	19 (100%)
	3 M	19 (100%)	16 (100%)	20 (100%)
Bacteroidetes	< 2 W	11 (100%)	18 (100%)	15 (93,8%)
	6 W	18 (85,7%)	17 (100%)	19 (95,0%)
	3 M	17 (89,5%)	16 (100%)	19 (95,0%)
<i>Bifidobacterium</i>	< 2 W	10 (90,9%)	11 (61,1%)	13 (81,3%)
	6 W	19 (90,5%)	15 (88,2%)	20 (100%)
	3 M	19 (100%)	15 (93,8%)	20 (100%)
<i>C. leptum</i> -Gruppe	< 2 W	3 (27,3%)	8 (44,4%)	6 (37,5%)
	6 W	10 (47,6%)	14 (82,4%)	15 (75,0%)
	3 M	10 (52,6%)	12 (75,0%)	18 (90,0%)
Enterobacteriaceae	< 2 W	10 (90,9%)	14 (77,8%)	10 (62,5%)
	6 W	15 (71,4%)	17 (100%)	20 (100%)
	3 M	16 (84,2%)	16 (100%)	20 (100%)
<i>Lactobacillus</i>	< 2 W	8 (72,7%)	16 (88,9%)	14 (87,5%)
	6 W	20 (95,2%)	17 (100%)	19 (95,0%)
	3 M	18 (94,7%)	15 (93,8%)	18 (90,0%)
<i>Staphylococcus</i>	< 2 W	8 (72,7%)	10 (55,6%)	12 (75,0%)
	6 W	19 (90,5%)	12 (70,6%)	12 (60,0%)
	3 M	15 (79,0%)	12 (75,0%)	14 (70,0%)
<i>C. difficile</i>	< 2 W	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	6 W	1 (4,8%)	1 (5,9%)	1 (5,0%)
	3 M	1 (5,3%)	3 (18,8%)	2 (10,0%)
<i>S. epidermidis</i>	< 2 W	8 (72,7%)	13 (72,2%)	12 (75,0%)
	6 W	20 (95,2%)	11 (64,7%)	13 (65,0%)
	3 M	13 (68,4%)	9 (56,3%)	16 (80,0%)

^a Prävalenzen in Anzahl und Prozent.

n, Anzahl der verfügbaren Fäzesproben; < 2 W, < 2 Wochen; 6 W, 6 Wochen; 3 M, 3 Monate

3.5.2 Diversität der Bifidobakterien

Die Zellzahlen der untersuchten Bifidobakterienspezies in den Fäzesproben der Muttermilchgruppe und der Anfangsmilchgruppen über den Zeitraum der Studie sind in **Abb. 3.4** dargestellt, die Prävalenzen der Spezies in **Tab. 3.5**. Die statistische Auswertung konnte aufgrund der geringen Präsenz einzelner Bifidobakterienspezies in den Fäzesproben und der hohen inter-individuellen Unterschiede (**Anhang Tab. A11**) nur zurückhaltend interpretiert werden.

Die Zellzahlen von *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium* und *B. pseudocatenulatum* in den Fäzesproben der Anfangsmilchgruppen überschritten die der REF-Gruppe um die vor der Studie festgelegte Äquivalenzdifferenz von $0,5 \log_{10}$ Zellen/g TM ($p = 0,069-0,926$; n. s.). Demnach verlief die Besiedlung mit diesen Bifidobakterienspezies bei den Anfangsmilchgruppen nicht äquivalent zu der in den gestillten Kindern.

B. adolescentis variierte zwischen den Studiengruppen um $2,5 \log_{10}$ ($7,0-9,5 \log_{10}$ Zellen/g TM). In der REF-Gruppe wurde für *B. adolescentis* nach 6 W eine Abnahme um $1,0 \log_{10}$ auf $7,0 \log_{10}$ Zellen/g TM und schließlich nach 3 M ein Abfallen unter die Bestimmungsgrenze beobachtet. Der in dieser Studie eingesetzte probiotische Stamm gehört taxonomisch zu *B. animalis*. Dieser war während der Studie in nahezu allen Fäzesproben der SYN-Gruppe (**Tab. 3.5**) mit etwa $9,5 \log_{10}$ Zellen/g TM nachweisbar. In einzelnen Proben der SYN-Gruppe wurde *B. animalis* jedoch bereits vor Studienbeginn nachgewiesen und in KON- und REF-Gruppe im Verlauf der Studie (**Tab. 3.5**). Sowohl die REF- als auch die SYN-Gruppe wiesen für *B. bifidum* im betrachteten Zeitraum stabile Werte von etwa $10,0-10,5 \log_{10}$ Zellen/g TM auf. Nach 3 M erreichte auch die KON-Gruppe diese Zellzahl nach anfänglich $8,5 \log_{10}$ Zellen/g TM. Die Besiedlung des Darms durch *B. breve* schien in allen Gruppen erst nach 2 W zu erfolgen. Von zunächst nur $5,5-6,50 \log_{10}$ Zellen/g TM stieg die Zellzahl bis auf $9,0-10,0 \log_{10}$ Zellen/g TM. Während in den Anfangsmilchgruppen *B. catenulatum* mit $9,0$ bis $9,5 \log_{10}$ Zellen/g TM vorhanden war, waren es im Studienverlauf in der REF-Gruppe mit $6,5$ bis $7,5 \log_{10}$ Zellen/g TM deutlich weniger Zellen. Obwohl *B. dentium* zu Beginn der Studie in fast keiner Fäzesprobe nachweisbar war (**Tab. 3.5**), erreichte diese Spezies am Ende der Studie in allen drei

Studiengruppen Zellzahlen von etwa 8,5 bis 9,5 log₁₀ Zellen/g TM. Die Zellzahlen von *B. longum* in den Fäzesproben der Kinder aus KON- und REF-Gruppe bewegten sich innerhalb der vordefinierten Äquivalenzdifferenz von 0,5 log₁₀ Zellen/g TM (**Tab. 2.9**; $p = 0,0148$). Danach erfolgte die Besiedlung mit dieser Spezies in der KON-Gruppe äquivalent zur Gruppe der gestillten Kinder. Dagegen überschritt die Zellzahl von *B. longum* in der SYN-Gruppe den festgelegte Bereich von 0,5 log₁₀ Zellen/g TM und zeigte daher keine analoge Besiedlung dieser Spezies zur REF-Gruppe. *B. pseudocatenulatum* war während der Studiendauer in allen Gruppen mit Zellzahlen von ca. 8,5-10,0 log₁₀ Zellen/g TM vertreten. In der KON-Gruppe war jedoch nach 3 M ein starker Abfall der Zellzahl auf 6,0 log₁₀ Zellen/g TM zu beobachten. Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass dieser Wert nur auf einer Fäzesprobe basiert (**Tab. 3.5**). Die dominanten Spezies in der KON- und der REF-Gruppe waren *B. bifidum*, gefolgt von *B. breve* und *B. catenulatum* (KON-Gruppe) bzw. *B. pseudocatenulatum* (REF-Gruppe). Dagegen waren es in der SYN-Gruppe *B. longum*, *B. bifidum*, *B. animalis* und *B. breve*. *B. angulatum*, *B. gallicum*, *B. pseudolongum* und *B. thermophilum* wurden in keiner der untersuchten Fäzesproben nachgewiesen

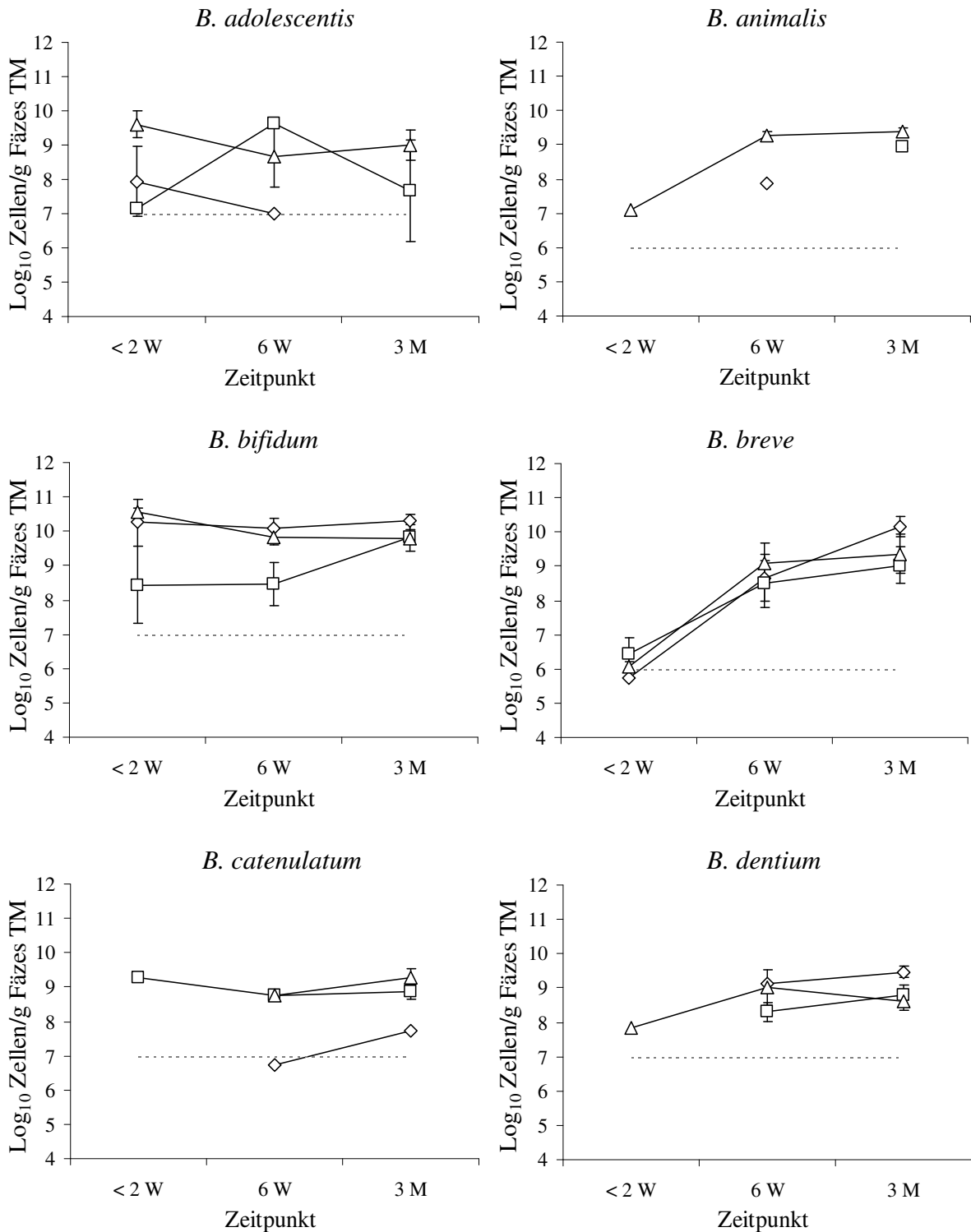


Abbildung 3.4. Fäkale Zellkonzentrationen von Bifidobacterienspezies in den Studiengruppen. Die Zeitpunkte < 2 Wochen (< 2 W), 6 Wochen (6 W) und 3 Monaten (3 M) stellen MW und SEM von 11, 21 und 19 gestillten Kindern (REF-Gruppe, ◇), 18, 17 und 16 Kindern aus der Kontroll-Anfangsmilchgruppe (KON-Gruppe, □) bzw. 16, 19 bzw. 20 Kindern aus der Synbiotikum-Anfangsmilchgruppe (SYN-Gruppe, △) dar. *B. angulatum*, *B. gallicum*, *B. pseudolongum* und *B. thermophilum* wurden in keiner Fäzesprobe nachgewiesen. Gruppenvergleiche basieren auf dem Mittel der Werte von 6 W und 3 M: Äquivalenztest, $\alpha = 0,025$; Gestrichelte Linie, Bestimmungsgrenze

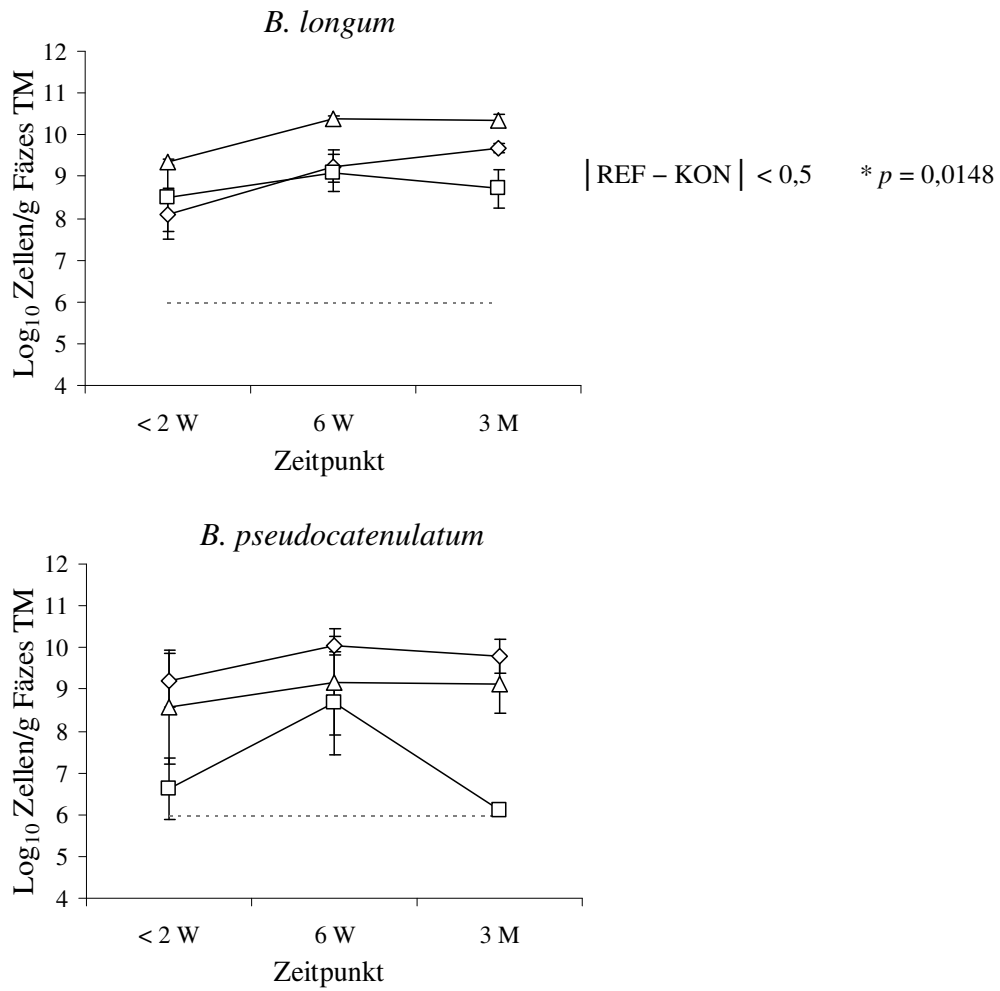


Abbildung 3.4. (Fortsetzung)

Das Vorkommen einzelner Bifidobakterienspezies in Fäzesproben von Kindern aus den Anfangsmilchgruppen unterschied sich teilweise von dem aus der REF-Gruppe (**Tab. 3.5**). Während *B. adolescentis* in Fäzesproben gestillter Kinder kaum detektiert wurde, war diese Spezies nach 6 W und 3 M in den Anfangsmilchgruppen häufiger vertreten (bis 4/20 Kindern). *B. animalis* wurde in fast allen Fäzesproben der SYN-Gruppe während der Studiendauer nachgewiesen. *B. bifidum* war in etwa 35% der Fäzesproben gestillter Kinder vorhanden. Die Prävalenz in den Anfangsmilchgruppen war vergleichbar, wobei bei der SYN-Gruppe nach 3 M fast doppelt so viele Fäzesproben (60%) *B. bifidum* aufwiesen wie bei der REF-Gruppe. *B. breve* war in Fäzesproben von Kindern der Anfangsmilchgruppen zu Studienbeginn stärker vertreten als bei gestillten Kindern (ca. 25% vs. 10%), wurde aber zu den späteren Zeitpunkten ähnlich oft nachgewiesen (ca. 50-70%). Während *B. catenulatum* bei gestillten Kindern eher selten detektiert wurde (1/21 nach 6 W bzw. 1/19 Kindern nach 3 M), wurde diese Spezies nach 3 M in Kindern der Anfangsmilchgruppen häufiger erfasst (4/16 bzw. 4/20 Kindern). Auch *B. dentium* kam in gestillten Kindern nur selten vor, in Kindern aus KON- und SYN-Gruppe hingegen öfter (ca. 30% bzw. 40% nach 6 W). *B. longum*, das auch die für Kinder charakteristische Subspezies *B. longum* ssp. *infantis* einschließt, war die am häufigsten vertretene Spezies in Fäzesproben aller Studiengruppen (ca. 65-80%). *B. pseudocatenulatum* wurde in etwa 25-35% der Fäzesproben von gestillten Kindern detektiert, wobei diese Spezies in Kindern der Anfangsmilchgruppen etwas seltener (ca. 10-30%) vorkam. Insgesamt wurden nur wenige Bifidobakterienspezies in den Fäzesproben der drei Studiengruppen nachgewiesen, was auf eine geringe Diversität der Gattung *Bifidobacterium* auf Speziesebene schließen lässt. In Fäzesproben der SYN-Gruppe wurde die höchste Anzahl an Bifidobakterienspezies erfasst (167 in insgesamt 56 Fäzesproben vs. 98 und 93 in jeweils 51 Fäzesproben der REF- und KON-Gruppe). Auch unter Berücksichtigung des möglichen Anteils, den der probiotische Stamm innerhalb von *B. animalis* einnimmt, erhält man im Vergleich zur REF- und KON-Gruppe mehr Bifidobakterienspezies, die in Fäzesproben der Interventionsgruppe nachgewiesen wurden (128). In den Fäzesproben von KON- und REF-Gruppe waren *B. longum*, *B. breve* und *B. bifidum* in absteigender Reihenfolge am häufigsten vertreten. In der SYN-Gruppe hatte *B. animalis* die höchste Prävalenz, gefolgt von *B. longum*, *B. breve* und *B. bifidum*.

Tabelle 3.5. Prävalenz der Bifidobakterienspezies in den Fäzesproben der Neugeborenen aus den Studiengruppen^a

Bifidobakterienspezies ^b	Zeitpunkt	Studiengruppe		
		REF-Gruppe	KON-Gruppe	SYN-Gruppe
		$n_{(<2\text{ W})} = 11$	$n_{(<2\text{ W})} = 18$	$n_{(<2\text{ W})} = 16$
		$n_{(6\text{ W})} = 21$	$n_{(6\text{ W})} = 17$	$n_{(6\text{ W})} = 20$
		$n_{(3\text{ M})} = 19$	$n_{(3\text{ M})} = 16$	$n_{(3\text{ M})} = 20$
<i>B. adolescentis</i>	< 2 W	2 (18,2%)	1 (5,6%)	2 (12,5%)
	6 W	1 (4,8%)	1 (5,9%)	4 (20,0%)
	3 M	–	2 (12,5%)	4 (20,0%)
<i>B. animalis</i>	< 2 W	–	–	1 (6,3%)
	6 W	1 (4,8%)	–	19 (95,0%)
	3 M	–	2 (12,5%)	19 (95,0%)
<i>B. bifidum</i>	< 2 W	4 (36,4%)	2 (11,1%)	2 (12,5%)
	6 W	7 (33,3%)	6 (35,3%)	6 (30,0%)
	3 M	7 (36,8%)	6 (37,5%)	12 (60,0%)
<i>B. breve</i>	< 2 W	1 (9,1%)	5 (27,8%)	4 (25,0%)
	6 W	10 (47,6%)	8 (47,1%)	13 (65,0%)
	3 M	11 (57,9%)	11 (68,8%)	14 (70,0%)
<i>B. catenulatum</i>	< 2 W	–	1 (5,6%)	–
	6 W	1 (4,8%)	2 (11,8%)	1 (5,0%)
	3 M	1 (5,3%)	4 (25,0%)	4 (20,0%)
<i>B. dentium</i>	< 2 W	–	–	1 (6,3%)
	6 W	1 (4,8%)	5 (29,4%)	8 (40,0%)
	3 M	2 (10,5%)	3 (18,8%)	8 (40,0%)
<i>B. longum</i>	< 2 W	6 (54,6%)	6 (33,3%)	2 (12,5%)
	6 W	14 (66,7%)	11 (64,7%)	16 (80,0%)
	3 M	14 (73,7%)	12 (75,0%)	16 (80,0%)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	< 2 W	3 (27,3%)	2 (11,1%)	2 (12,5%)
	6 W	5 (23,8%)	2 (11,8%)	3 (15,0%)
	3 M	7 (36,8%)	1 (6,3%)	6 (30,0%)

^a Prävalenzen in Anzahl und Prozent.

^b *B. angulatum*, *B. gallicum*, *B. pseudolongum* und *B. thermophilum* wurden in keiner Fäzesprobe detektiert.

n, Anzahl der verfügbaren Fäzesproben; < 2 W, < 2 Wochen; 6 W, 6 Wochen; 3 M, 3 Monate;

– Nicht detektiert

3.6 Überlebensfähigkeit des probiotischen Stammes CNCM I-3446 nach der Darmpassage

Für die Überprüfung, ob der Stamm CNCM I-3446 nach oraler Aufnahme der supplementierten Säuglingsanfangsmilch die Darmpassage überlebt, wurden die Fäzesproben vor der Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Glycerin versetzt, um die darin aktiven Bakterien bis zur Analyse lebensfähig zu erhalten. Nachdem zunächst unterschiedliche Verdünnungsstufen der fixierten Fäzesproben auf Tomatensaft-Agar ausplattiert wurden, erfolgte die Identifizierung von CNCM I-3446 unter den gewachsenen Bakterienkolonien über den Nachweis eines stammspezifischen Transposons. Die Nachweisgrenze betrug 2×10^3 KBE/g Fäzes FM. Die Prävalenz lebender Zellen von CNCM I-3446 in Fäzesproben der Studienteilnehmer ist in **Abb. 3.5** dargestellt. Während zu Beginn der Studie in keiner Fäzesprobe aus der SYN-Gruppe lebende Zellen von CNCM I-3446 nachgewiesen wurden, waren es nach 6 W und 3 M 90% bzw. 80% der untersuchten Proben (SYN- vs. REF-Gruppe: nach 6 W, $p = 0,0076$; nach 3 M, $p = 0,0023$). Damit wurde die Überlebensfähigkeit von CNCM I-3446 in Gegenwart von Kuhmilcholigosacchariden während der Lagerung im pulverisierten Testprodukt und anschließender Passage durch den Gastrointestinaltrakt gezeigt. Lebende CNCM I-3446-Zellen wurden auch in jeweils einer Probe der REF- und KON-Gruppe nach 6 W bzw. 3 M detektiert, obwohl in diesen Gruppen keine Einnahme des Synbiotikums erfolgte.

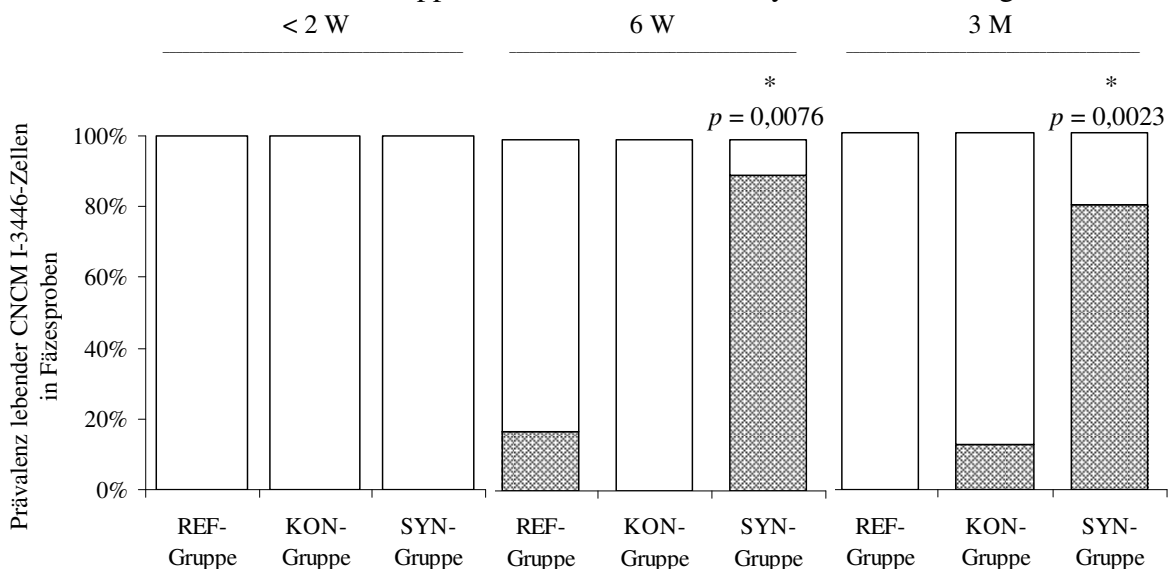


Abbildung 3.5. Prävalenz lebender Zellen von CNCM I-3446 in den Fäzes der Studienteilnehmer. Die Zeitpunkte < 2 Wochen (< 2 W), 6 Wochen (6 W) und 3 Monate (3 M) stellen Werte von 1, 6 und 7 gestillten Kindern (REF-Gruppe), 6, 12 und 8 Kindern aus der Kontroll-Anfangsmilchgruppe (KON-Gruppe) bzw. 8, 10 und 10 Kindern aus der Synbiotikum-Anfangsmilchgruppe (SYN-Gruppe) dar. $\alpha = 0,025$.

3.7 Fäkale Immunmarker

sIgA wurde als Marker für die Aktivität des Immunsystems an der Darm-assoziierten Mukosa verwendet. Durch die kovalente Bindung an die sekretorische Komponente ist IgA gegenüber proteolytischem und mikrobiellen Abbau im Darm geschützt und kann somit in aktiver Form in den Fäzes nachgewiesen werden. AAT wurde als Marker für Darmpermeabilitätsstörungen herangezogen, die durch akute Entzündungen hervorgerufen werden. Bei erhöhter Durchlässigkeit wird vermehrt AAT ins Darmlumen sezerniert. Aufgrund seiner antiproteolytischen Aktivität als Inhibitor von Serinproteasen ist es relativ stabil und wird fast unverändert in den Fäzes ausgeschieden.

Eine statistische Analyse der ermittelten Werte zwischen den Studiengruppen konnte aufgrund der sehr geringen Anzahl an vorhandenen Fäzesproben nicht durchgeführt werden. Die Konzentrationen von Gesamt-sIgA und AAT aller verfügbaren Fäzesproben sind in **Abb. 3.6** dargestellt und können nur zurückhaltend interpretiert werden.

Da von der REF-Gruppe keine Fäzesproben vom Studienbeginn vorhanden waren, um die Immunmarker zu bestimmen, war ein Vergleich mit den Anfangsmilchgruppen zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Während die sIgA-Konzentrationen aller Gruppen nach 6 W ähnlich waren, wurden in KON- und SYN-Gruppe nach 3 M niedrigere Werte als in der REF-Gruppe gemessen. Im Verlauf der Studie wurde eine steigende Tendenz sowohl in der REF- als auch in der KON-Gruppe festgestellt. Die Konzentrationen an fäkalem ATT in den Anfangsmilchgruppen waren nach 6 W und 3 M tendenziell niedriger als in der REF-Gruppe. Während die Werte in der KON-Gruppe weitgehend unverändert blieben, sanken sie in der REF- und SYN-Gruppe im Studienverlauf.

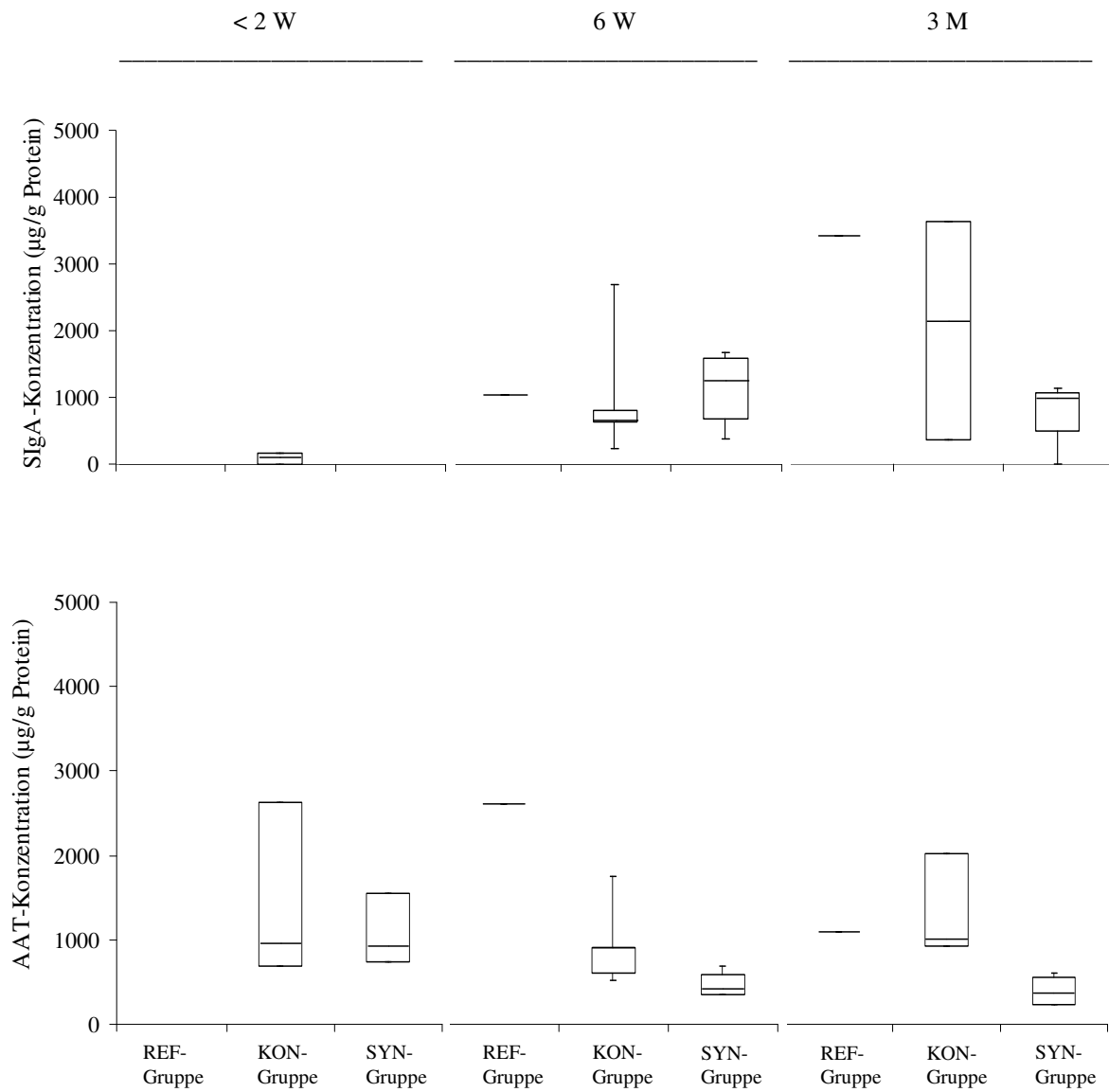


Abbildung 3.6. Konzentrationen von fäkalem Gesamt-sIgA und AAT der Kinder aus den Studiengruppen. Die Zeitpunkte < 2 Wochen (< 2 W), 6 Wochen (6 W) und 3 Monate (3 M) stellen Minima, 25. Perzentile, Mediane, 75. Perzentile und Maxima von 0, 1 und 1 gestillten Kindern (REF-Gruppe), 3, 5 und 3 Kindern aus der KON-Anfangsmilchgruppe (KON-Gruppe) bzw. 3, 4 und 4 Kindern aus der Synbiotikum-Anfangsmilchgruppe (SYN-Gruppe) dar.

4 Diskussion

4.1 Hintergrund zur Etablierung *groEL*-Gen-basierter quantitativer Real-Time PCR-Verfahren für die spezifische Quantifizierung von Bifidobakterienspezies in humanen Fäzes

Mit der Entwicklung kultivierungsunabhängiger Methoden zur Identifizierung von Bakterien stellt die 16S rRNA-Gensequenz einen wertvollen und daher auch den am häufigsten verwendeten molekularen Marker dar (Fox *et al.*, 1980). Das 16S rRNA-Gen von Bifidobakterien erlaubt mit einer durchschnittlichen Sequenzidentität von 95% (Miyake *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2006) eine Unterscheidung der meisten Spezies dieser Gattung. Jedoch ist die Diskriminierungsfähigkeit des 16S rRNA-Gens unter eng verwandten Spezies mit mehr als 97% begrenzt. Aufgrund der kurzen Äste zwischen einigen Knoten im phylogenetischen Stammbaum, der auf dem 16S rRNA-Gen basiert, kann vermutet werden, dass Bifidobakterien in einer relativ kurzen Zeit divergiert sind (Leblond-Bourget *et al.*, 1996) und somit einen hohen Grad an Verwandtschaft aufweisen. Um den Einfluss des Synbiotikums auf die intestinale Bifidobakterienpopulation in Neugeborenen zu untersuchen, wurde nach einem Marker gesucht, der eine präzise Identifizierung von Bifidobakterienspezies erlaubt. Die bisher untersuchten alternativen Zielgene umfassen die Haushaltsgene *atpD* (Ventura *et al.*, 2004a), *dnak* (Ventura *et al.*, 2005), *groEL* (Jian *et al.*, 2001; Masco *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2004b; Zhu *et al.*, 2003), *groES* (Ventura *et al.*, 2004b), *recA* (Kullen *et al.*, 1997; Ventura und Zink 2003), *tal* (Requena *et al.*, 2002), *tuf* (Ventura *et al.*, 2003; Ventura und Zink 2003) und *xfp* (Berthoud *et al.*, 2005; Ventura *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2005). Alle aufgeführten Gene, mit Ausnahme von *groES*, ermöglichten eine vergleichbare oder sogar bessere Diskriminierung von Bifidobakterien als das 16S rRNA-Gen. Jedoch sind bislang nur wenige Sequenzen dieser Markergene verfügbar. Die meisten Sequenzen existieren für das *groEL*-Gen, das für das ubiquitär vorkommende Chaperonin GroEL (Synonyme sind Cpn60, GroL, Hsp60 und MopA) kodiert. Das Protein spielt eine essentielle Rolle bei der Bewältigung von zellulärem Stress; z. B. wird das Rückfalten von fehl gefalteten Proteinen unterstützt. In Übereinstimmung mit dieser zentralen Zellfunktion ist die Gensequenz von GroEL evolutionär stark konserviert. Die Chaperonin Datenbank <http://www.cpndb.ca> (Hill

et al., 2004) umfasst derzeit mehr als 17000 Sequenzeinträge, v. a. für das *groEL*-Gen von Prokaryoten, Eukaryoten und Archaea. Dabei kommen 135 Sequenzen auf 28 Bifidobakterienspezies.

Der phylogenetische Stammbaum, der auf kurzen Fragmenten des *groEL*-Gens (538 bp, gelegen an der Position von etwa 250-840 der entsprechenden Nukleotidsequenz), längeren (~1200 bp) oder kompletten *groEL*-Gensequenzen (~1600 bp) von Bifidobakterienspezies (Masco *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2004b) beruht, zeigte zu dem auf dem 16S rRNA-Gen basierenden Stammbaum eine große Ähnlichkeit (Miyake *et al.*, 1998). Es kann daher angenommen werden, dass beide Moleküle ähnliche phylogenetische Informationen enthalten. Allerdings sind die Sequenzidentitäten des *groEL*-Gens zwischen den Bifidobakterienspezies geringer als die des 16S rRNA-Gens (Jian *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2003). Die Übereinstimmung der partiellen *groEL*-Gensequenzen (~550 bp) bei Bifidobakterienspezies beträgt 80-96%, wodurch eine hohe Diskriminierungsfähigkeit auf Speziesebene gegeben ist (Zhu *et al.*, 2003). Die Analyse von längeren (~1200 bp) und kompletten *groEL*-Sequenzen (~1600 bp) erlaubt sogar die Unterscheidung von *B. animalis* und *B. longum* auf Subspeziesebene (Masco *et al.*, 2004; Ventura *et al.*, 2004b). Das *groEL*-Gen erfüllt damit die Voraussetzungen, um als zuverlässiger, alternativer, phylogenetischer Marker für Bifidobakterienspezies eingesetzt werden zu können. Seit *groEL* als geeigneter molekularer Marker in der phylogenetischen Analyse von Bifidobakterien durch Jian *et al.* (2001) vorgeschlagen wurde, wurde *groEL* zunehmend für die Taxonomie von Bifidobakterienspezies genutzt (Jian und Dong 2002; Killer *et al.*, 2011; Killer *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2008; Simpson *et al.*, 2004).

Da die 16S rRNA-Gensequenzen von *B. catenulatum* und *B. pseudocatenulatum* zu 99,5% identisch sind (Miyake *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 2006), erlaubt dieser molekulare Marker keine Unterscheidung zwischen den Spezies. Daher wurden beide Spezies bisher immer zusammen als *B. catenulatum*-Gruppe erfasst (Haarman und Knol 2005; Matsuki *et al.*, 2004; Mullié *et al.*, 2003). Mit den in dieser Arbeit entwickelten qPCR-Verfahren konnten *B. catenulatum* und *B. pseudocatenulatum* jedoch leicht differenziert werden, da sie nur 91–93% Sequenzidentität im *groEL*-Genfragment von etwa 550 bp aufzeigen (Jian *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2003). Auch der evolutionäre Abstand zwischen Stämmen von *B. breve*

und *B. longum* war mit mehr als 96% 16S rRNA-Gensequenzidentität nicht möglich darzustellen (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). Das traf ebenso für folgende Spezies zu: *B. adolescentis/B. dentium*, *B. breve/B. pseudolongum*, *B. catenulatum/B. dentium* und *B. longum/B. pseudolongum* (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). Dagegen ermöglichte der in dieser Arbeit ausgewählte Bereich des *groEL*-Gens eine klare Diskriminierung zwischen diesen Spezies (Jian *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2003).

4.1.1 Vorteil des *single-copy groEL*-Gens gegenüber dem *multicopy*-16S rRNA-Gen

Durch *Southern Blot* Experimente und Genomsequenzierungen wurde gezeigt, dass das Genom von Bifidobakterien nur eine Kopie von *groEL* enthält (Garrigues *et al.*, 2010; Schell *et al.*, 2002; Ventura *et al.*, 2004b; Zhurina *et al.*, 2011). Dagegen liegen die ribosomalen RNA (*rrn*) Operone in der Zelle in zwei bis fünf Kopien vor. Unterschiede in der Kopienzahl treten bei Bifidobakterien nicht nur auf Spezies- sondern auch auf Stammebene auf (Bourget *et al.*, 1993; Candela *et al.*, 2004; Satokari *et al.*, 2001a). Die variierende Anzahl an *rrn* Operonen und die Mikroheterogenität der 16S rRNA-Genkopien tragen zu einer Verzerrung in der PCR-basierten Quantifizierung bei (Satokari *et al.*, 2001a; von Wintzingerode *et al.*, 1997). Eine Quantifizierung von Bifidobakterienspezies auf der Grundlage eines *single-copy*-Gens hat gegenüber einem *multicopy* Gen, wie dem 16S rRNA-Gen, den entscheidenden Vorteil, dass eine exakte Erfassung der Zellzahl über die Bestimmung der *groEL*-Genkopien möglich ist. Bisher basierte die molekulare Quantifizierung der Bifidobakterien (als Gattung) meist auf dem *rrn* Operon (Haarman und Knol 2005; Matsuki *et al.*, 2004). Für eine genauere Zellzahlbestimmung der gesamten Gattung könnte ein *single-copy*-Gen wie *groEL* herangezogen werden. Das Alignment der kompletten *groEL*-Sequenzen aller in **Tab. 2.5** aufgeführten Bifidobakterien offenbarte jedoch keinen Konsensusbereich von ausreichender Länge auf, der für das Ableiten von gattungsspezifischen Oligonukleotid-Primern notwendig gewesen wäre.

Obwohl die in dieser Arbeit entwickelten qPCR-Verfahren auf einem *single-copy*-Gen basieren, sind die ermittelten Bestimmungsgrenzen mit der vergleichbar, die für die Quantifizierung der Gattung *Bifidobacterium* anhand des *multicopy*-16S rRNA-Gens in der Studie von Matsuki *et al.* (2004) mit $6 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes FM angegeben wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die hier vorgestellten qPCR-Verfahren sehr sensitiv sind.

4.1.2 Einschränkungen mit *groEL* als molekularen Marker

Als Bifidobakterien erstmals auf Basis des *groEL*-Gens phylogenetisch analysiert wurden, waren nur 73 *groEL*-Sequenzen bekannt (Jian *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2003). Mit zunehmendem Interesse an *groEL* als einem leistungsfähigen phylogenetischen Marker und durch zahlreiche Genomsequenzierungen von Bifidobakterien steigen die Einträge in der Chaperonin Datenbank kontinuierlich an. Dennoch ist die Zahl von 135 Sequenzen für Bifidobakterien immer noch eingeschränkt (Hill *et al.*, 2004). Obwohl für die Mehrzahl der 40 bisher beschriebenen Bifidobakterienspezies (<http://www.dsmz.de>) *groEL*-Sequenzen vorliegen, umfassen die meisten nur einen Bereich von etwa 600 bp (Positionen 250-840 bp im kompletten Gen). Außerdem stehen für einige Spezies bislang nur eine oder zwei Sequenzen zur Verfügung (z. B. für *B. angulatum* und *B. catenulatum*, **Tab. 2.5**).

4.2 Modulation der intestinalen Mikrobiota gesunder Neugeborener durch die Art der Ernährung

Die frühe postnatale Ernährung wirkt sich entscheidend auf die mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts von Neugeborenen aus. Humane Muttermilch bewirkt, dass der Darm von gestillten Säuglingen meist von Bifidobakterien dominiert wird (Harmsen *et al.*, 2000). Dagegen ist die intestinale Mikrobiota von nicht gestillten Säuglingen komplexer zusammengesetzt. Bifidobakterien können auch hier überwiegen, wobei Bacteroides, Clostridien, und *E. coli* einen höheren Anteil einnehmen (Harmsen *et al.*, 2000).

Zahlreiche klinische Studien belegen, dass Stillkinder seltener an akuter Mittelohrentzündung, gastrointestinalen und respiratorischen Infektionen als nicht gestillte Säuglinge leiden (Ip *et al.*, 2007). Darüber hinaus wirkt sich die Ernährung des Neugeborenen auch langfristig auf die Gesundheit des Kindes aus. So steht Stillen im Zusammenhang mit einem geringeren Risiko für atopische Erkrankungen, Adipositas und Typ-1/Typ-2-Diabetes mellitus im späteren Leben (Ip *et al.*, 2007; Koletzko *et al.*, 2010; Madsen *et al.*, 2010; Oddy 2004; Patelarou *et al.*, 2012).

Es wird angenommen, dass der gesundheitsfördernde Effekt von humaner Milch teilweise über die Mikrobiota im Darm vermittelt wird. So trägt die mikrobielle Besiedlung des

Darms wesentlich zur Entwicklung des zunächst noch unreifen Immunsystems bei, indem sie die Ausdifferenzierung des darmassoziierten lymphatischen Gewebes und die Induktion der oralen Toleranz im Neugeborenen fördert (Brandtzaeg 2010; Brandtzaeg 2002). Ein hoher Anteil an Bifidobakterien im Darm von gestillten Kindern wird daher mit einer verbesserten Gesundheit gegenüber nicht gestillten Kindern assoziiert (Corthésy *et al.*, 2007; Neu *et al.*, 2007).

Neue Ansätze in der Weiterentwicklung von industriell hergestellter Säuglingsnahrung zielen darauf ab, dem gesundheitlichen Vorteil von Muttermilch nachzukommen. Dies soll über die Modulation der intestinalen Mikrobiota umgesetzt werden. Um eine ähnliche Zusammensetzung der Darmmikrobiota wie in gestillten Säuglingen zu fördern, sollte vor allem das Wachstum von Bifidobakterien stimuliert werden. Lebensmittelzusätze wie Pro- und/oder Präbiotika könnten ähnliche modulierende Wirkungen auf die intestinale Mikrobiota wie Inhaltsstoffe aus humaner Milch übernehmen (Mountzouris *et al.*, 2002). Die Bewertung von Synbiotika in Säuglingsmilch durch kontrollierte Studien beschränkte sich bisher nur auf deren Sicherheit und Verträglichkeit bei gesunden Kindern. In diesen Studien wurden folgende Kombinationen eingesetzt: *B. longum* BL999 + GOS/FOS (Puccio *et al.*, 2007), *B. lactis/Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* CRL-431 + GOS (Vlieger *et al.*, 2009), *B. longum* BL999/*L. rhamnosus* LPR + GOS/FOS und *B. longum* BL999/*L. paracasei* ST11 + GOS/FOS (Chouraqui *et al.*, 2008). Die vorliegende Studie legt erstmals die Wirksamkeit einer Synbiotikum-haltigen Säuglingsnahrung dar.

4.2.1 Bifidogene Wirkung der Säuglingsanfangsmilch mit CNCM I-3446 und Kuhmilchholigosacchariden

Die vorliegende Studie verfolgte den Ansatz, eine synergistische Wirkung aus dem lyophilisierten probiotischen Bifidobakterienstamm CNCM I-3446 und den gleichzeitig verabreichten Kuhmilchholigosacchariden als geeignetes Wachstumssubstrat zu erzielen. Die Intervention begann bereits mit einem Alter der Kinder von höchstens 14 Tagen. In dieser Phase der sich etablierenden intestinalen Mikrobiota ist der modulierende Einfluss durch die Art der Ernährung wahrscheinlich sehr groß. So wurde in der Studie von Nakamura *et al.* (2009) nach Verabreichen von Präbiotika-haltiger Säuglingsnahrung eine weniger stabile mikrobielle Gemeinschaft in jüngeren verglichen zu älteren Kindern (Alter

2 Wochen bis 3 Monate) beobachtet. Mit 4 Wochen hat sich bereits eine bis zur Einführung fester Nahrung weitgehend stabile Darmmikrobiota entwickelt (Mountzouris *et al.*, 2002). Eine für den erwachsenen Menschen typische Mikrobiota ist mit etwa zwei Jahren etabliert (Mackie *et al.*, 1999; Nakayama 2010).

Die zu untersuchende Säuglingsanfangsmilch, die das Synbiotikum aus CNCM I-3446 und Kuhmilcholigosacchariden enthielt, förderte das Wachstum der erwünschten Laktatproduzierenden Laktobazillen und Bifidobakterien. Dagegen wurde dies mit einer Anfangsmilch gleicher Zusammensetzung, aber ohne Synbiotikum, nicht beobachtet. Innerhalb der ersten 1,5 Monate kam es sowohl bei der Interventions- als auch Referenzgruppe zu einer Zunahme von Laktobazillen. Die fäkalen Zellkonzentrationen dieser Bakterienpopulation waren unter dem Einfluss des Synbiotikums äquivalent zu denen der gestillten Kinder ($9,07 \pm 0,32$ und $9,90 \pm 0,27 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM [MW \pm SEM]; $p < 0,0019$; Äquivalenzdifferenz von $1 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM) und überstiegen die aus der Kontrollgruppe ($8,27 \pm 0,31 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM [MW \pm SEM]). Eine analoge Entwicklung der Bifidobakterien unter dem Einfluss des Synbiotikums wurde nicht erreicht. Jedoch überstieg die Zellzahl der Bifidobakterien in der Interventionsgruppe die aus der Referenz- ($11,54 \pm 0,05$ vs. $11,0 \pm 0,17 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM [MW \pm SEM]) und Kontrollgruppe ($10,54 \pm 0,24 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM [MW \pm SEM]). Das Synbiotikum stimulierte damit das Wachstum von Bifidobakterien und übertraf sogar die bifidogene Wirkung der Muttermilch.

In einigen Studien wurde ein Wachstumsvorteil von Bifidobakterien und Laktobazillen gegenüber anderen Bakterien der intestinalen Mikrobiota bereits durch den alleinigen Zusatz eines Pro- oder Präbiotikums in Säuglingsanfangsnahrung erreicht. So wurde nach Verabreichen einer mit Galaktooligosacchariden (GOS), GOS/Fruktooligosacchariden (FOS) bzw. GOS/FOS/sauren Oligosacchariden (AOS) supplementierten Anfangsmilch ein Anstieg (Bakker-Zierikzee *et al.*, 2005; Ben *et al.*, 2008; Costalos *et al.*, 2008; Decsi *et al.*, 2005; Fanaro *et al.*, 2005; Haarman und Knol 2005; Knol *et al.*, 2005; Magne *et al.*, 2008; Moro *et al.*, 2002; Schmelzle *et al.*, 2003; Scholtens *et al.*, 2008) für Bifidobakterien und Laktobazillen (absolut oder relativ zu Gesamtbakterien) im Vergleich zur entsprechenden Säuglingsnahrung ohne Supplementation festgestellt. Das Wachstum dieser Bakterien

wurde durch eine Anfangsmilch mit GOS (0,24 g/100 ml) sogar in ähnlicher Weise dem in gestillten Kindern stimuliert (Ben *et al.*, 2008). Jedoch war die relative Bifidobakterienpopulation der Anfangsmilchgruppe mit GOS (0,6 g/100 ml) in der Studie von Bakker-Zierikzee *et al.* (2005b) nur mit der aus der Kontrollgruppe (Anfangsmilch ohne Supplementation) vergleichbar.

Eine Anfangsmilch mit einem *B. bifidum*-Stamm (neuere Bezeichnung *B. animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446) führte zu einer höheren und zu gestillten Kindern vergleichbaren Prävalenz von Bifidobakterien in Fäzesproben von 1-Monat alten Neugeborenen im Vergleich zur entsprechenden Milch ohne Zusatz an probiotischen Bakterien (60% vs. 20%; Langhendries *et al.*, 1995). Diese Prävalenzen wurden durch kulturabhängige Methoden ermittelt. Dagegen wurden in der vorliegenden Studie in fast jeder Fäzesprobe, unabhängig der Gruppenzugehörigkeit, Bifidobakterien molekularbiologisch nachgewiesen (90-100%). Der probiotische Stamm CNCM I-3446 schien aber keinen Einfluss auf die Zellzahlen (absolut oder relativ zu Gesamtbakterien) für Bifidobakterien zu haben (Langhendries *et al.*, 1995; Bakker-Zierikzee *et al.*, 2005a).

Der Zusatz von Präbiotika (AOS, GOS, GOS/FOS, GOS/FOS/AOS) oder Probiotika (*B. animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446) zu einer Säuglingsanfangsnahrung hatte keinen Einfluss auf die absoluten Zellzahlen von Vertretern der Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*; Ben *et al.*, 2008; Fanaro *et al.*, 2005; Langhendries *et al.*, 1995; Moro *et al.*, 2002). Jedoch verringerte sich der relative Anteil von *E. coli* an den Gesamtbakterien im Vergleich zur Kontrollgruppe (Costalos *et al.*, 2008; Scholtens *et al.*, 2008). In der Studie von Penders *et al.* (2005) wurde mittels molekularer Methoden in gestillten Kindern sowohl eine geringere Prävalenz als auch eine Erniedrigung der Zellzahlen von *E. coli* im Vergleich zu nicht gestillten Kindern beobachtet. In der vorliegenden Studie war die Zellkonzentration für Enterobacteriaceae in den Studiengruppen ähnlich, aber nicht äquivalent. Die Prävalenz von Enterobacteriaceae war jedoch in den Fäzesproben der gestillten Kinder am geringsten (70-85% vs. 100%).

Der Anteil von *Clostridium* spp. bzw. der *Clostridium coccooides*-Gruppe an den Gesamtbakterien wurde durch die Zugabe von Präbiotika (GOS/FOS bzw. GOS/FOS/AOS)

in einer Säuglingsanfangsmilch verringert (Costalos *et al.*, 2008; Magne *et al.*, 2008; Scholtens *et al.*, 2008). Jedoch blieb in der vorliegenden Studie die *C. leptum*-Gruppe unter dem Einfluss des Synbiotikums unverändert.

Staphylokokken (gesamte Gattung *Staphylococcus* und *S. epidermidis*) wurden etwas häufiger in gestillten als in nicht gestillten Kindern detektiert. Dieser Befund stimmt mit älteren Studien überein (Fanaro *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, 2008; Kleessen *et al.*, 1995). Die Hauptvertreter der Staphylokokken, *S. aureus* und *S. epidermidis*, stellen kommensale Bakterien der intestinalen Mikrobiota dar und werden bereits kurz nach der Geburt (Sakata *et al.*, 1985) über den Hautkontakt von den Eltern auf das Neugeborene übertragen (Jiménez *et al.*, 2008; Lindberg *et al.*, 2004). Da während des Stillens ein intensiver Kontakt mit der Brustwarze und der umliegenden Haut besteht, könnte so das erhöhte Vorkommen von Staphylokokken/*S. epidermidis* sowie die höheren Zellzahlen von *S. epidermidis* in gestillten verglichen mit nicht gestillten Kindern erklärt werden. *S. aureus* und *S. epidermidis* können potenziell nosokomiale Infektionen auslösen (Byrne *et al.*, 2007; Neumeister *et al.*, 1995; RKI 2011; Vuong und Otto 2002), obwohl *S. epidermidis*-Isolate aus Fäzesproben gestillter Kinder nur eine geringe Virulenz aufwiesen und sensitiv gegenüber den meisten getesteten Antibiotika waren (Jiménez *et al.*, 2008).

C. difficile stellt einen häufigen Krankenhauserreger dar, der Antibiotikum-assoziierte Diarrhö und pseudomembranöse Kolitis verursachen kann (Voth und Ballard 2005). Neugeborene sind häufig mit *C. difficile* besiedelt und weisen im Gegensatz zu Erwachsenen auch bei Vorkommen Toxin produzierender pathogener Stämme keine Symptome auf (Kelly *et al.*, 1994; Mackie *et al.*, 1999). Die Resistenz von Neugeborenen gegenüber den *C. difficile*-Toxinen könnte auf die noch nicht vollständig entwickelten membranständigen Toxinrezeptoren der Enterozyten zurückzuführen sein (Eglow *et al.*, 1992). Nach dem ersten Lebensjahr steigt jedoch die Anfälligkeit von Kindern gegenüber Infektionen durch dieses Bakterium an (Kelly *et al.*, 1994). In der niederländischen KOALA-Geburt-Studie wurden Kaiserschnitt, Frühgeburt, industriell hergestellte Säuglingsnahrung und Krankenhausaufenthalt mit einer erhöhten Prävalenz und Zellkonzentration von *C. difficile* in Verbindung gebracht (Penders *et al.*, 2006). Weiterhin wurde in der genannten Studie ein Zusammenhang zwischen der Besiedlung mit *C. difficile*

und einem höheren Risiko für atopische Erkrankungen gefunden (Penders *et al.*, 2007). Während *C. difficile* in 30% nicht gestillter Kinder mit etwa $7,5 \log_{10}$ Zellen/g FM nachgewiesen wurde, waren es nur 14% gestillte Kinder mit Zellzahlen von etwa $3,5 \log_{10}$ Zellen/g FM (Penders *et al.*, 2005). Eine verstärkte Besiedlung mit diesem Bakterium in nicht gestillten im Vergleich zu gestillten Säuglingen wurde auch in anderen Studien beobachtet (Benno *et al.*, 1984; Cooperstock *et al.*, 1982; Tonooka *et al.*, 2005; Tullus *et al.*, 1989). Die Anwesenheit von *C. difficile* könnte ein Hinweis auf eine noch nicht vollständig entwickelte intestinale Mikrobiota mit geringer Diversität sein (Adlerberth und Wold 2009). Das Bakterium scheint sich in einer zunehmend komplexen Mikrobiota weniger gut durchsetzen zu können, wodurch es am Ende des ersten Lebensjahres seltener nachzuweisen ist (Tullus *et al.*, 1989). Schließlich sind nur 4% der älteren Kinder und 0,7% der Erwachsenen mit *C. difficile* besiedelt (Mackie *et al.*, 1999). Während Erwachsene weniger als $4 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes aufweisen (Adlerberth und Wold 2009), können in Kindern relativ hohe Zellzahlen von bis zu $7,5 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes erreicht werden (Penders *et al.*, 2006; Penders *et al.*, 2005; Tonooka *et al.*, 2005). In der vorliegenden Studie wurden deutlich höhere Werte von $7,5-10,0 \log_{10}$ Zellen/g Fäzes TM gemessen (s. **Anhang Tab. A10**). Die Prävalenz von *C. difficile* war in allen Gruppen sehr viel niedriger als aus der Literatur bekannt. Jedoch wurde auch ein tendenziell höheres Vorkommens von *C. difficile* in nicht gestillten verglichen zu den gestillten Kindern verzeichnet. In dieser Arbeit wurde über den Nachweis des Toxin B kodierenden Gens der Großteil aller toxigenen Stämme von *C. difficile* (Toxin B Produzierer) erfasst (Peterson *et al.*, 2007). Eine Aussage zu den Toxinkonzentrationen in den Fäzesproben wurde jedoch nicht getroffen. Der bisherige Nachweis von *C. difficile* wurde meist unabhängig vom Vorhandensein von Toxin kodierenden Genen durchgeführt (Benno *et al.*, 1984; Penders *et al.*, 2005; Tonooka *et al.*, 2005). Dadurch wurden auch Stämme, die nicht in der Lage sind, Toxine zu produzieren, erfasst. Die geringere Prävalenz von *C. difficile* in dieser Arbeit könnte damit auf den Ausschluss nicht pathogener Stämme zurückzuführen sein.

In den oben genannten Studien wurde der Einfluss von Probiotika oder Präbiotika in einer Säuglingsanfangsmilch oft nur mit einer Kontrollgruppe ohne entsprechenden Zusatz verglichen. Jedoch sollte für die wissenschaftliche Bewertung einer industriell hergestellten Säuglingsnahrung ein Vergleich zu gesunden gestillten Kindern als „Goldstandard“

erfolgen (SCF 2003). Die hier vorgestellte Studie berücksichtigte die Empfehlung des Wissenschaftlichen Ausschusses für Lebensmittel der Europäischen Kommission.

Während *B. animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446 in Säuglingsanfangsmilch allein keinen Einfluss auf die fäkale Bifidobakterienpopulation von Kindern zu haben schien (Bakker-Zierikzee *et al.*, 2005; Langhendries *et al.*, 1995), hatte die kombinierte Gabe mit Kuhmilcholigosacchariden in der vorliegenden Studie einen starken bifidogenen Effekt. Das Synbiotikum stimulierte ebenfalls das Wachstum von Laktobazillen. Somit näherte sich das Profil der intestinalen Mikrobiota von Kindern, die das synbiotische Produkt erhielten, hinsichtlich der Dominanz von Bifidobakterien, dem von gestillten Kindern an. Es wäre jedoch auch möglich, dass die bifidogene Wirkung durch die alleinige Supplementation von Kuhmilcholigosacchariden erreicht worden wäre. Eine entsprechende Interventionsgruppe war im hier angewandten Studiendesign aber nicht vorgesehen. Unter dem Einfluss des Synbiotikums kam es nicht zu einer äquivalenten Besiedlung der übrigen hier untersuchten Bakteriengruppen zu gestillten Kindern. Dieser Befund könnte darauf zurückzuführen sein, dass die vordefinierten Äquivalenzdifferenzen, die auf einer einzigen vorhergehenden Studie basieren (Enea Rezzonico, persönliche Mitteilung), aufgrund der kleinen Studienpopulation und unterschiedlicher analytischer Methoden nicht für die vorliegende Studie geeignet sind. Die Prävalenz von Taxa, die Darmpathogene einschließen (z. B. Enterobacteriaceae, *Staphylococcus*, *C. difficile*), war bei den gestillten Kindern geringer als bei den nicht gestillten Kindern. Die Supplementation führte demnach nicht, wie in gestillten Kindern, zu einer Hemmung möglicher pathogener Bakterien.

Das hier untersuchte Synbiotikum unterstützte das Wachstum der Bifidobakterien im Gastrointestinaltrakt gesunder Neugeborener. Weiterführend war es interessant, welchen Einfluss das Synbiotikum auf die Diversität der Bifidobakterien hatte.

4.2.2 Erhöhte Anzahl an Bifidobakterienspezies durch Säuglingsanfangsmilch mit CNCM I-3446 und Kuhmilcholigosacchariden

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, ob die Supplementation eines Synbiotikums in Säuglingsnahrung eine ähnliche Diversität der Bifidobakterienpopulation wie in gestillten Kindern hervorruft. Für eine spezifische Quantifizierung von Bifidobakterienspezies in humanen Fäzes wurden in der vorliegenden Arbeit *groEL*-Genbasierte qPCR-Verfahren entwickelt und validiert. Die geringen Prävalenzen einzelner Bifidobakterienspezies und die großen inter-individuellen Unterschiede (z. B. bezüglich *B. adolescentis*), wie sie auch in vorherigen Studien beobachtet wurden (Magne *et al.*, 2008; Turroni *et al.*, 2009a), ließen die Interpretation der statistisch ausgewerteten Daten aber nur eingeschränkt zu.

B. adolescentis, eine für die intestinale Mikrobiota von Erwachsenen charakteristische Bifidobakterienspezies (He *et al.*, 2001b; Junick und Blaut 2012; Mackie *et al.*, 1999; Matsuki *et al.*, 1999; Nakayama 2010; Ouwehand *et al.*, 2001; Reuter 2001; Satokari *et al.*, 2001a), wurde kaum und nur in geringen Konzentrationen in Fäzesproben gestillter Kinder gefunden. Dagegen wurde *B. adolescentis* in nicht gestillten Kindern etwas häufiger und in höheren Zellzahlen nachgewiesen. Dieser Befund stimmt teilweise mit der Studie von Haarman und Knol (2005) überein; *B. adolescentis* wie sowohl in gestillten Kindern als auch in Kindern, die eine GOS/FOS-haltige Anfangsmilch erhielten, geringere Zellzahlen auf als in den Kindern der Kontrollgruppe (Anfangsmilch ohne Supplementation).

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Bifidobakterienspezies war *B. animalis* in nahezu allen Fäzesproben der Interventionsgruppe mit konstanten Zellzahlen im Studienverlauf und nur geringen inter-individuelle Unterschiede vorhanden. Das ist wahrscheinlich auf die regelmäßige Zufuhr der *B. animalis* ssp. *lactis*-haltigen Anfangsmilch zurückzuführen. Obwohl das Synbiotikum-haltige Produkt ausschließlich in der Interventionsgruppe verabreicht wurde, wurde *B. animalis* auch vereinzelt in Kontroll- und Referenzgruppe detektiert. Diese Beobachtung wurde mit dem Nachweis lebender CNCM I-3446-Zellen in diesen Gruppen bestätigt. Bisher ging man davon aus, dass *B. animalis* keine autochthone Art der humanen intestinalen Mikrobiota darstellt, sondern im Darm verschiedener Tiere vorkommt (Biavati und Mattarelli 2006). Sowohl CNCM I-

3446 als auch viele andere Stämme von *B. animalis* werden als Probiotika eingesetzt (z. B. HN019, DN-173), was der Grund dafür sein könnte, dass der Organismus auch in Fäzesproben nachgewiesen wird. Jedoch wurde diese Spezies auch ohne Verzehr von probiotischen Produkten in humanen Fäzesproben detektiert (Bartosch *et al.*, 2005; Junick und Blaut 2012; Turrone *et al.*, 2009a; Enea Rezzonico, persönliche Mitteilung). Das Vorkommen von *B. animalis* lässt sich daher nicht ausschließlich auf den Verzehr der supplementierten Säuglingsanfangsmilch zurückführen.

Die *B. catenulatum*-Gruppe (*B. catenulatum* und *B. pseudocatenulatum*) gehört in Erwachsenen zu den dominanten Bifidobakterien. Weniger häufig wurde sie in gestillten Kindern aus Japan nachgewiesen (Matsuki *et al.*, 2004; Matsuki *et al.*, 1999; Nakayama 2010). Die hier entwickelten *groEL*-Gen-basierten qPCR-Verfahren erlaubten eine differenzierte Erfassung der *B. catenulatum*-Gruppe. In der vorliegenden Studie wurde *B. catenulatum* in gestillten Kindern selten und in nicht gestillten Kindern etwas häufiger erfasst. Bei *B. pseudocatenulatum* war es umgekehrt. Die Prävalenz beider Spezies war, ähnlich wie in der Studie von Matsuki *et al.* (1999; 19%), nach 1,5 Monaten in allen Gruppen vergleichbar. Nach 3 Monaten übertrafen sie diese sogar um etwa das Doppelte. Dagegen erhielten Haarman und Knol (2005) im Vergleich zur Kontrollnahrung geringere Werte für die *B. catenulatum*-Gruppe in gestillten Kindern und in Kindern, die eine GOS/FOS-haltige Anfangsmilch erhielten (1,9-1,4% vs. 8,1%). In der Studie von Gore *et al.* (2008) wurde die Anwesenheit von *B. pseudocatenulatum* mit Ernährung durch industriell hergestellte Säuglingsmilch assoziiert, was in der vorliegenden Studie aber nicht zutraf.

B. dentium kommt in Zahnbelag, aber auch Zahnkaries vor (Mantzourani *et al.*, 2009; Modesto *et al.*, 2006). Als potenziell kariogenes Bakterium gehört es der Risikogruppe 2 an (<http://www.dsmz.de>). Von der Mundhöhle aus könnte es in den Darm gelangen. Bislang wurde es in Fäzesproben nur selten nachgewiesen (Matsuki 2004a, Matsuki 1999, Rinne 2005). Das häufigere Auftreten von *B. dentium* in Fäzesproben von Kindern aus den Anfangsmilchgruppen im Vergleich zu den gestillten Kindern könnte sich über den Speichelkontakt zwischen Eltern und Kind bei der Zubereitung der Säuglingsnahrung (Abschmecken) erklären. Interessanterweise wurde *B. dentium* in den Fäzesproben der

Neugeborenen in hohen Zellzahlen nachgewiesen. Erwachsene weisen im Vergleich dazu deutlich niedrigere Werte auf (Junick und Blaut 2012; Matsuki *et al.*, 2004). Diese Beobachtung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich in Erwachsenen bereits, anders als in Neugeborenen, eine stabile mikrobielle Gemeinschaft herausgebildet hat, in der diese potenziell pathogene Spezies unterdrückt wird.

In der Studie von Malinen *et al.* (2002), in der gesunde Erwachsene ein Synbiotikumhaltiges Produkt (GOS und CNCM I-3446) verzehrten, schien der probiotische Stamm CNCM I-3446 während der Einnahme *B. longum* zu verdrängen. In der hier vorgestellten Studie wurde das Gegenteil beobachtet. *B. longum* wies in der Interventionsgruppe, verglichen mit den anderen beiden Studiengruppen, nicht nur deutlich höhere Zellzahlen, sondern auch ein verstärktes Vorkommen auf. Die in dieser Arbeit entwickelten qPCR-Verfahren zur Identifizierung von Bifidobakterienspezies beruhen auf einem Sequenzbereich des *groEL*-Gens, welcher für *B. longum* ssp *infantis* und *B. longum* ssp *longum* nahezu identisch ist. Um feststellen zu können, ob durch die Einnahme des Synbiotikums das Wachstum der für Kinder charakteristischen Subspezies *B. longum* ssp *infantis* stimuliert wird, müsste die komplette *groEL*-Gensequenz (Ventura *et al.*, 2004b) oder ein anderes Zielgen wie *xfp* (Ventura *et al.*, 2006) gewählt werden, das die Differenzierung von *B. longum* auf Subspeziesebene erlaubt

B. angulatum, *B. gallicum*, *B. pseudolongum* und *B. thermophilum* wurden in keiner Fäzesprobe erfasst. Aus der Literatur ist bekannt, dass diese Bifidobakterienspezies selten im Menschen vorkommen (Biasucci *et al.*, 2008; Biavati und Mattarelli 2006; Lauer 1990; Matsuki *et al.*, 1999; Turroni *et al.*, 2009a; von Ah *et al.*, 2007).

B. bifidum, *B. breve* und *B. longum* stellen die in Kindern am häufigsten vorkommenden Bifidobakterienspezies dar. Allerdings unterscheiden sie sich in verschiedenen Studien in der Reihenfolge ihrer Prävalenz (Matsuki *et al.*, 1999; Mikami *et al.*, 2009; Nakayama 2010; Ouwehand *et al.*, 2001; Reuter 2001; Roger *et al.*, 2010; Sakata *et al.*, 2005; Satokari *et al.*, 2002). Die Reihenfolge der Häufigkeiten in der vorliegenden Studie stimmt mit der von Matsuki *et al.* (1999) berichteten überein (*B. longum* [mit *B. longum* ssp. *infantis*] > *B. breve* > *B. bifidum*). Während Kontroll- und Referenzgruppe hinsichtlich der

zahlenmäßig dominanten Spezies (*B. bifidum* > *B. breve*) sowie der Spezies mit der höchsten Prävalenz (*B. longum* > *B. breve* > *B. bifidum*) übereinstimmten, waren diese Abfolgen unter dem Einfluss des Synbiotikums leicht verändert. Die dominante Spezies der Interventionsgruppe war *B. longum*, gefolgt von *B. bifidum*, *B. animalis* und *B. breve*. *B. animalis* wies in dieser Gruppe die höchste Prävalenz auf. In ähnlicher Weise wie bei den anderen Studiengruppen nahmen die Prävalenzen von *B. longum*, *B. breve* und *B. bifidum* ab. Auch in anderen Arbeiten wurde eine ähnliche Bifidobakterienpopulation trotz unterschiedlicher Ernährung (Muttermilch oder industriell hergestellte Säuglingsanfangsmilch) beobachtet (Klaassens *et al.*, 2009; Kleessen *et al.*, 1995; Sakata *et al.*, 2005; Satokari *et al.*, 2002). Als einzigen Unterschied beobachteten Satokari *et al.* (2002) die Abwesenheit von *B. breve* in nicht gestillten Kindern. Der relative Anteil von *B. breve* blieb in gestillten Kindern und Kindern, die eine GOS/FOS-haltige Säuglingsanfangsmilch erhielten, weitgehend konstant, während er in der Kontrollgruppe (Anfangsmilch ohne Supplemente) abnahm (Haarman und Knol 2005). In der Studie von Gore *et al.* (2008) stand die Anwesenheit von *B. bifidum* deutlich mit Stillen in Verbindung. In der vorliegenden Studie wurde jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *B. breve* und *B. bifidum* und gestillten Kindern festgestellt.

Die Anzahl der Bifidobakterienspezies in humanen Fäzesproben scheint durch Alter, Ernährung, Prävalenz für atopische Erkrankungen in verschiedenen geographischen Regionen und Allergiestatus beeinflusst zu werden. Insgesamt ist die Diversität mit meist drei bis vier Spezies in Erwachsenen und bis zu drei Spezies in gestillten Neugeborenen eher gering (Junick und Blaut 2012; Matsuki *et al.*, 1999; Satokari *et al.*, 2002). Die Diversität der Bifidobakterien ist in gestillten Kindern größer als in nicht gestillten und sie nimmt mit dem Abstillen weiter zu (Roger *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu beobachteten Satokari *et al.* (2002) keinen ernährungsabhängigen Unterschied in der Bifidobakterienpopulation. Gestillte Kinder aus Ländern mit einer hohen Prävalenz für atopische Erkrankungen (Neuseeland, UK) zeigten im Vergleich zu solchen Kindern mit einer niedrigen Prävalenz (Ghana) eine deutlich höhere Bifidobakteriendiversität (Young *et al.*, 2004). Im Gegensatz hierzu war die Diversität der Bifidobakterien bei einer kleinen Studienpopulation in gestillten, allergischen Kindern geringer als in gesunden Kindern (Ouwehand *et al.*, 2001). Während bei der vorliegenden Studie die Anzahl aller

Bifidobakterienspezies in Referenz- und Kontrollgruppe ähnlich war, schien das Synbiotikum die Ansiedlung einer höheren Anzahl von Bifidobakterienspezies zu begünstigen. Dieser Unterschied erstreckte sich nicht nur auf Kinder-typische Spezies wie *B. bifidum*, sondern auch auf Kinder-untypische Spezies (*B. adolescentis*) oder auf Spezies, die den Darm nur transient besiedeln (*B. dentium*). Die erhöhte Prävalenz einzelner Bifidobakterienspezies, v. a. *B. bifidum*, *B. dentium*, *B. longum*, aber auch *B. animalis*, lässt vermuten, dass das Synbiotikum auch die Diversität der Bifidobakterien in den Fäzesproben erhöht. Demnach zeigt diese Studie, dass Ernährung einen Einfluss auf die Bifidobakterienpopulation hat.

Bifidobakterienspezies, die typischerweise in Kindern vorkommen, zeigen durch den Besitz einer großen Bandbreite von Glykosidasen eine Anpassung an die komplexen Oligosaccharide der Muttermilch (Schell *et al.*, 2002; Sela *et al.*, 2008; Sela und Mills 2010). Während die Fähigkeit, HMOs zu verstoffwechseln, unter *B. longum* ssp. *infantis* konserviert ist, weisen andere für Kinder charakteristische Bifidobakterienspezies (*B. bifidum*, *B. breve*) stammspezifische Variationen auf (LoCascio *et al.*, 2010; LoCascio *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu können die oft als Supplemente eingesetzten FOS von den meisten Bifidobakterien, nicht jedoch von *B. bifidum* und *B. breve* (Falony 2009), als Substrate genutzt werden, so dass diese im Vergleich zu den HMOs nicht das Wachstum einzelner Bifidobakterienspezies bzw. -stämme selektiv fördern (Sela und Mills 2010; Ward *et al.*, 2007). Die hier eingesetzten Kuhmilcholigosaccharide führten zu einer höheren Prävalenz der untersuchten Spezies als in der Kontrollgruppe. Vor allem das Wachstum von *B. bifidum*, *B. breve* und *B. longum* wurde stark stimuliert, wodurch sie sogar häufiger in Fäzesproben der Kinder aus der Interventionsgruppe als in gestillten Kindern nachgewiesen wurden. Das Gemisch der natürlich vorkommenden Oligosacchariden aus Kuhmilch stellt demnach ein sehr gutes Wachstumssubstrat für viele hier nachgewiesenen Bifidobakterienspezies dar, förderte aber besonders das Wachstum der für Kinder typischen Spezies.

Es ist bisher weitgehend unklar, welche Bedeutung einzelne Bifidobakterienspezies in der intestinalen Mikrobiota für den Menschen haben und auf welchen molekularen Mechanismen ihre Interaktion mit dem Wirt beruht. Während allergische Kinder ein eher für Erwachsene typisches Bifidobakterienprofil (*B. adolescentis*, *B. catenulatum*-Gruppe)

aufweisen, findet man bei gesunden Kindern meist Spezies, die charakteristisch für gestillte Kinder sind wie *B. bifidum* (Gore *et al.*, 2008; Grönlund *et al.*, 2007; Haarman und Knol 2005; He *et al.*, 2001a; Ouwehand 2007; Ouwehand *et al.*, 2001). Es wird daher vermutet, dass bestimmte Bifidobakterienspezies die mukosale Barriere verstärken, indem sie u. a. immunmodulatorisch wirken, wodurch sowohl Darminfektionen (Fukuda *et al.*, 2011) als auch atopischen Erkrankungen vorgebeugt werden könnte. Es wurde gezeigt, dass das Wachstum pathogener Darmbakterien wie *Salmonella*, *Listeria* und *Campylobacter* durch Bifidobakterien gehemmt werden kann. Die stärkste Wachstumshemmung wurde für *B. longum* (*B. longum* ssp. *infantis* und *B. longum* ssp. *longum*) beobachtet, das bakteriozid oder bakteriostatisch wirkende Substanzen (Bakteriozine) bildet (Gibson und Wang 1994). Auch für *B. bifidum* NCFB 1454 und *B. animalis* ssp. *lactis* wurden antimikrobielle Wirkungen gegen Darmerreger über die Bildung der Bakteriozine Bifidocin B und Bifilact Bb12 beschrieben (Cheikhyoussef *et al.*, 2008; Yildirim und Johnson 1998). Weiterhin zeigten die aus Fäzesproben gesunder Kinder isolierten *B. bifidum*-Stämme eine signifikant höhere Fähigkeit, an humane intestinale Mukosa anzuhaften als *B. adolescentis*-Stämme, die aus allergischen Kindern isoliert wurden waren (He *et al.*, 2001a). Stark adhäsive Bifidobakterienstämme könnten eher mit M-Zellen, die den wichtigsten Teil der induktiven Seite des gastrointestinalen Immunsystems darstellen, in Kontakt kommen als Stämme mit einem geringen Adhäsionspotenzial. Dadurch können die basal gelegenen Makrophagen und Lymphozyten stimuliert und die Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen und spezifischen Antikörpern erhöht werden. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass Bifidobakterien in der Lage sind, die durch Makrophagen sezernierten Zytokine zu beeinflussen (He *et al.*, 2002). So induzierte *B. adolescentis* mehr proinflammatorische Zytokine (IL-12 und TNF- α) als *B. bifidum* und *B. breve*, ohne die Bildung antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) auszulösen. Durch *in vitro*-Screening-Tests wurden in humanen Fäzes Stämme von *B. longum* und *B. breve* identifiziert, die die Bildung großer Mengen an sIgA induzieren. Die Induktion von Cholera-Toxin-spezifischen sIgA durch einen *B. breve* Stamm wurde im Mausmodell bestätigt (Yasui *et al.*, 1992). In einer randomisiert-kontrollierten Studie wurde über die Gabe einer fermentierten Säuglingsanfangsmilch das Wachstum von *B. longum* ssp. *infantis* und *B. breve* gefördert. Gleichzeitig korrelierte die Zellzahl dieser Bifidobakterienspezies mit der fäkalen Poliovirus-spezifischen sIgA Konzentration (Mullié *et al.*, 2004). Auch für *B. bifidum*

wurde eine immunstimulierende Wirkung über eine verstärkte Bildung von intestinalen sIgA nachgewiesen (Park *et al.*, 2002). Ziel der Gabe von Prä- und/oder Probiotika sollte daher nicht eine unspezifische Anreicherung von Bifidobakterien sein. Es sollte eine Wachstumsförderung von Spezies erfolgen, die das Immunsystem positiv stimulieren, indem sie eine Entzündungsreaktion vorbeugen oder ihr entgegen wirken.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die hier vorgestellte randomisiert-kontrollierten, klinischen Studie liefert zum ersten Mal, über die Sicherheit und Verträglichkeit hinaus, einen Beitrag zur Wirkung einer Synbiotikum-haltigen Säuglingsnahrung auf die sich etablierende intestinale Mikrobiota gesunder Neugeborener. Die Säuglingsnahrung mit dem probiotischen Stamm *B. animalis* ssp. *lactis* CNCM I-3446 und Kuhmilchligosacchariden förderte das Wachstum von Laktobazillen und insbesondere das von Bifidobakterien. So wird eine bifidogene Wirkung, wie sie von der Muttermilch ausgeht, auch durch die Supplementation mit dem hier verwendeten Synbiotikum erreicht. Die vorliegende Studie hebt sich von bisherigen Studien über industriell hergestellter Säuglingsnahrung dahingehend ab, dass Bifidobakterien weiter auf der Speziesebene untersucht wurden. So zeigt die Studie, dass das Synbiotikum eine synergistische Wirkung erzielt, indem sowohl das Überleben des probiotischen Stammes gewährleistet, als auch die endogene Bifidobakterienpopulation stimuliert wird. Letzteres wurde anhand von qPCR-Verfahren, die in dieser Arbeit, basierend auf dem für Bifidobakterien geeigneten phylogenetischen Zielgen *groEL* entwickelt wurden, umfangreich analysiert. Nicht nur Kinder-typische Bifidobakterienspezies wie *B. bifidum* und *B. breve*, sondern auch für Erwachsene charakteristische Spezies (*B. adolescentis*) wurden häufiger in Fäzesproben der Interventionsgruppe nachgewiesen. Bei der Weiterentwicklung von Säuglingsnahrung sollte nicht unspezifisch das Wachstum von Bifidobakterien bewirkt werden. Vielmehr sollten in Anlehnung an gestillte Kinder, Bifidobakterienspezies oder -stämme gefördert werden, die die mukosale Barriere stärken können. Da nur wenige Fäzesproben für die Bestimmung der Immunmarker sIgA und α_1 -Antitrypsin zur Verfügung standen, war es in dieser Studie nicht möglich, einen Zusammenhang zwischen nachgewiesenen Bifidobakterienspezies und dem Zustand der mukosalen Barriere herzustellen. In zukünftigen Studien sollte diese Analyse mit einer größeren Studienpopulation gewährleistet werden, da die alleinige Erfassung von Bakterien keine Aussage über die Gesundheit liefern kann. Für eine valide Bewertung der Wirksamkeit von Säuglingsnahrung sollten, über die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota hinaus, weitere klinische Parameter (v. a. respiratorische und gastrointestinale Infektionen, atopische Erkrankungen, Allergien) aufgenommen und über einen deutlich längeren Interventionszeitraum als die ersten drei Lebensmonate verfolgt werden.

- Adlerberth, I., und A. E. Wold, 2009. Establishment of the gut microbiota in western infants. *Acta Paediatr.* 98, 229-38.
- Aldredge, D. L., M. R. Geronimo, S. Hua, C. C. Nwosu, C. B. Lebrilla, und D. Barile, 2013. Annotation and structural elucidation of bovine milk oligosaccharides and determination of novel fucosylated structures. *Glycobiology* 23, 664-76.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, und D. J. Lipman, 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-10.
- Archibald, F., 1983. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol. Lett.* 19, 29-32.
- Bäckhed, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, und J. I. Gordon, 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-20.
- Bakker-Zierikzee, A. M., M. S. Alles, J. Knol, F. J. Kok, J. J. Tolboom, und J. G. Bindels, 2005. Effects of infant formula containing a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable *Bifidobacterium animalis* on the intestinal microflora during the first 4 months of life. *Br. J. Nutr.* 94, 783-90.
- Barile, D., N. Tao, C. B. Lebrilla, J.-D. Coisson, M. Arlorio, und J. B. German, 2009. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. *Int. Dairy J.* 19, 524-530.
- Bartosch, S., A. Fite, G. T. Macfarlane, und M. E. McMurdo, 2004. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3575-81.
- Bartosch, S., E. J. Woodmansey, J. C. Paterson, M. E. McMurdo, und G. T. Macfarlane, 2005. Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 40, 28-37.
- Ben, X. M., J. Li, Z. T. Feng, S. Y. Shi, Y. D. Lu, R. Chen, und X. Y. Zhou, 2008. Low level of galacto-oligosaccharide in infant formula stimulates growth of intestinal bifidobacteria and lactobacilli. *World J. Gastroenterol.* 14, 6564-8.
- Benno, Y., K. Sawada, und T. Mitsuoka, 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol. Immunol.* 28, 975-86.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, und E. W. Sayers, 2011. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 39, D32-7.
- Bernet, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser, und A. L. Servin, 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4121-8.

- Berthoud, H., F. Chavagnat, M. Haueter, und M. G. Casey, 2005. Comparison of partial gene sequences encoding a phosphoketolase for the identification of bifidobacteria. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 38, 101-105.
- Biasucci, G., B. Benenati, L. Morelli, E. Bessi, und G. Boehm, 2008. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J. Nutr.* 138, 1796S-1800S.
- Biavati, B., und P. Mattarelli, 2006. The family *Bifidobacteriaceae*. in M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, und E. Stackebrandt, eds.: *The Prokaryotes* (Springer, New York, NY).
- Björck, L., C.-G. Rosén, V. Marshall, und B. Reiter, 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 30, 199.
- Bourget, N., J. M. Simonet, und B. Decaris, 1993. Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium breve* strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and *rrn* loci number. *FEMS Microbiol. Lett.* 110, 11-20.
- Braegger, C., A. Chmielewska, T. Decsi, S. Kolacek, W. Mihatsch, L. Moreno, M. Piescik, J. Puntis, R. Shamir, H. Szajewska, D. Turck, und J. van Goudoever, 2011. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 52, 238-50.
- Brandtzaeg, P., 2010. Homeostatic impact of indigenous microbiota and secretory immunity. *Benef. Microbes* 1, 211-27.
- Brandtzaeg, P. E., 2002. Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 964, 13-45.
- Bryant, M. P., 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1324-8.
- Bustin, S. A., und T. Nolan, 2004. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 15, 155-66.
- Byrne, F. J., S. M. Waters, P. S. Waters, W. Curtin, und M. Kerin, 2007. Development of a molecular methodology to quantify *Staphylococcus epidermidis* in surgical washout samples from prosthetic joint replacement surgery. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 17, 449-456.
- BZgA, 2001. Stillen und Muttermilchernährung. *Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung*. Gesundheitsförderung Konkret Band 3.
- Candela, M., B. Vitali, D. Matteuzzi, und P. Brigidi, 2004. Evaluation of the *rrn* operon copy number in *Bifidobacterium* using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 229-32.

- Chaturvedi, P., C. D. Warren, C. R. Buescher, L. K. Pickering, and D. S. Newburg, 2001. Survival of human milk oligosaccharides in the intestine of infants. in *Bioactive Components of Human Milk* (KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBL, New York).
- Cheikhoussef, A., N. Pogori, W. Chen, and H. Zhang, 2008. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 215-22.
- Chichlowski, M., J. B. German, C. B. Lebrilla, and D. A. Mills, 2011. The influence of milk oligosaccharides on microbiota of infants: opportunities for formulas. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 331-51.
- Chipman, D. M., and N. Sharon, 1969. Mechanism of lysozyme action. *Science* 165, 454-65.
- Chouraqui, J. P., D. Grathwohl, J. M. Labaune, J. M. Hascoet, I. de Montgolfier, M. Leclaire, M. Giarre, and P. Steenhout, 2008. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 87, 1365-73.
- Cleusix, V., C. Lacroix, S. Vollenweider, M. Duboux, and G. Le Blay, 2007. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* 7, 101.
- Cooperstock, M. S., E. Steffen, R. Yolken, and A. Onderdonk, 1982. *Clostridium difficile* in normal infants and sudden infant death syndrome: an association with infant formula feeding. *Pediatrics* 70, 91-5.
- Corthésy, B., H. R. Gaskins, and A. Mercenier, 2007. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J. Nutr.* 137, 781S-90S.
- Costalos, C., A. Kapiki, M. Apostolou, and E. Papathoma, 2008. The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and stool microbiology of term infants. *Early Hum. Dev.* 84, 45-9.
- Cummings, J. H., and G. T. Macfarlane, 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.* 70, 443-59.
- Davidson, L. A., and B. Lönnerdal, 1988. Specific binding of lactoferrin to brush-border membrane: ontogeny and effect of glycan chain. *Am. J. Physiol.* 254, G580-5.
- Decsi, T., A. Arató, M. Balogh, T. Dolinay, A. H. Kanjo, E. Szabó, and A. Várkonyi, 2005. [Randomised placebo controlled double blind study on the effect of prebiotic oligosaccharides on intestinal flora in healthy infants]. *Orv. Hetil.* 146, 2445-50.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman, 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635-8.

- Edwards, C. A., und A. M. Parrett, 2002. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *Br. J. Nutr.* 88 Suppl 1, S11-8.
- Eglow, R., C. Pothoulakis, S. Itzkowitz, E. J. Israel, C. J. O'Keane, D. Gong, N. Gao, Y. L. Xu, W. A. Walker, und J. T. LaMont, 1992. Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J. Clin. Invest.* 90, 822-9.
- El-Hawiet, A., E. N. Kitova, P. I. Kitov, L. Eugenio, K. K. Ng, G. L. Mulvey, T. C. Dingle, A. Szpacenko, G. D. Armstrong, und J. S. Klassen, 2011. Binding of *Clostridium difficile* toxins to human milk oligosaccharides. *Glycobiology* 21, 1217-27.
- Elli, M., R. Zink, A. Rytz, R. Reniero, und L. Morelli, 2000. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. *J. Appl. Microbiol.* 88, 695-703.
- Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini, und V. Vigi, 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr. Suppl.* 91, 48-55.
- Fanaro, S., J. Jelinek, B. Stahl, G. Boehm, R. Kock, und V. Vigi, 2005. Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 41, 186-90.
- FAO/WHO, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.*
- Favier, C. F., W. M. de Vos, und A. D. Akkermans, 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* 9, 219-29.
- Favier, C. F., E. E. Vaughan, W. M. De Vos, und A. D. Akkermans, 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 219-26.
- Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. S. Tanner, L. J. Magrum, L. B. Zablen, R. Blakemore, R. Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen, und C. R. Woese, 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science* 209, 457-63.
- Fukuda, S., H. Toh, K. Hase, K. Oshima, Y. Nakanishi, K. Yoshimura, T. Tobe, J. M. Clarke, D. L. Topping, T. Suzuki, T. D. Taylor, K. Itoh, J. Kikuchi, H. Morita, M. Hattori, und H. Ohno, 2011. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 469, 543-7.
- Garrigues, C., E. Johansen, und M. B. Pedersen, 2010. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, a widely consumed probiotic strain. *J. Bacteriol.* 192, 2467-8.

- German, J. B., S. L. Freeman, C. B. Lebrilla, und D. A. Mills, 2008. Human milk oligosaccharides: evolution, structures and bioselectivity as substrates for intestinal bacteria. *Nestlé Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program* 62, 205-18; discussion 218-22.
- Gibson, G. R., und X. Wang, 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 412-20.
- Goldenberg, O., S. Herrmann, G. Marjoram, M. Noyer-Weidner, G. Hong, S. Bereswill, und U. B. Göbel, 2007. Molecular monitoring of the intestinal flora by denaturing high performance liquid chromatography. *J. Microbiol. Methods* 68, 94-105.
- Goldman, A. S., 1993. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12, 664-671.
- Gopal, P. K., und H. S. Gill, 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1, S69-74.
- Gore, C., K. Munro, C. Lay, R. Bibiloni, J. Morris, A. Woodcock, A. Custovic, und G. W. Tannock, 2008. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* is associated with atopic eczema: a nested case-control study investigating the fecal microbiota of infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 135-40.
- Grönlund, M. M., M. Gueimonde, K. Laitinen, G. Kociubinski, T. Grönroos, S. Salminen, und E. Isolauri, 2007. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* 37, 1764-72.
- Grönlund, M. M., O. P. Lehtonen, E. Eerola, und P. Kero, 1999. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 28, 19-25.
- Guo, X., X. Xia, R. Tang, J. Zhou, H. Zhao, und K. Wang, 2008. Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 367-73.
- Haarman, M., und J. Knol, 2005. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2318-24.
- Hansson, G. C., und M. E. Johansson, 2010. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Gut Microbes* 1, 51-54.
- Harmsen, H. J., A. C. Wildeboer-Veloo, G. C. Raangs, A. A. Wagendorp, N. Klijjn, J. G. Bindels, und G. W. Welling, 2000. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30, 61-7.

- He, F., A. C. Ouwehand, E. Isolauri, H. Hashimoto, Y. Benno, and S. Salminen, 2001a. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 30, 43-7.
- He, F., A. C. Ouwehand, E. Isolauri, M. Hosoda, Y. Benno, and S. Salminen, 2001b. Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors. *Curr. Microbiol.* 43, 351-4.
- Heilig, H. G., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. Akkermans, and W. M. de Vos, 2002. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 114-23.
- Hendrixson, D. R., J. Qiu, S. C. Shewry, D. L. Fink, S. Petty, E. N. Baker, A. G. Plaut, and J. W. St Geme, 3rd, 2003. Human milk lactoferrin is a serine protease that cleaves *Haemophilus* surface proteins at arginine-rich sites. *Mol. Microbiol.* 47, 607-17.
- Hill, J. E., S. L. Penny, K. G. Crowell, S. H. Goh, and S. M. Hemmingsen, 2004. cpnDB: a chaperonin sequence database. *Genome Res.* 14, 1669-75.
- Hooper, L. V., T. Midtvedt, and J. I. Gordon, 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 283-307.
- Hopkins, M. J., R. Sharp, and G. T. Macfarlane, 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 48, 198-205.
- Howie, P. W., J. S. Forsyth, S. A. Ogston, A. Clark, and C. D. Florey, 1990. Protective effect of breast feeding against infection. *Br. Med. J.* 300, 11-6.
- Ip, S., M. Chung, G. Raman, P. Chew, N. Magula, D. DeVine, T. Trikalinos, and J. Lau, 2007. Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid. Rep. Technol. Assess. (Full Rep.)* 1-186.
- Jian, W., and X. Dong, 2002. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 809-12.
- Jian, W., L. Zhu, and X. Dong, 2001. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1633-8.
- Jiménez, E., S. Delgado, A. Maldonado, R. Arroyo, M. Albújar, N. García, M. Jarrod, L. Fernández, A. Gómez, and J. M. Rodríguez, 2008. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.* 8, 143.

- Johnston, B. C., und S. Vohra, 2009. Probiotika und antibiotikaassoziierte Diarrhö bei Erwachsenen und Kindern. in S. C. Bischoff, ed.: *Probiotika, Präbiotika und Synbiotika* (Thieme Verlag, Stuttgart).
- Junick, J., und M. Blaut, 2012. Quantification of human fecal *Bifidobacterium* species by use of quantitative real-time PCR analysis targeting the *groEL* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2613-22.
- Kelly, C. P., C. Pothoulakis, und J. T. LaMont, 1994. *Clostridium difficile* colitis. *N. Engl. J. Med.* 330, 257-62.
- Killer, J., J. Kopečný, J. Mrázek, I. Koppová, J. Havlík, O. Benada, und T. Kott, 2011. *Bifidobacterium actinocoloniiforme* sp. nov. and *Bifidobacterium bohemicum* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 1315-21.
- Killer, J., J. Kopečný, J. Mrázek, V. Rada, O. Benada, I. Koppová, J. Havlík, und J. Straka, 2009. *Bifidobacterium bombi* sp. nov., from the bumblebee digestive tract. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 2020-4.
- Kim, M. S., S. W. Roh, und J. W. Bae, 2010. *Bifidobacterium stercoris* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 2823-7.
- Kim, W. S., T. Tanaka, H. Kumura, und K. Shimazaki, 2002. Lactoferrin-binding proteins in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochem. Cell Biol.* 80, 91-4.
- Klaassens, E. S., R. J. Boesten, M. Haarman, J. Knol, F. H. Schuren, E. E. Vaughan, und W. M. de Vos, 2009. Mixed-species genomic microarray analysis of fecal samples reveals differential transcriptional responses of bifidobacteria in breast- and formula-fed infants. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2668-76.
- Kleessen, B., E. Bezirtzoglou, und J. Mättö, 2000. Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb. Ecol. in Health and Dis.* 2, S53-S63.
- Kleessen, B., H. Bunke, K. Tovar, J. Noack, und G. Sawatzki, 1995. Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. *Acta Paediatr.* 84, 1347-56.
- Knol, J., P. Scholtens, C. Kafka, J. Steenbakkers, S. Groß, K. Helm, M. Klarczyk, H. Schöpfer, H. M. Böckler, und J. Wells, 2005. Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 40, 36-42.
- Koletzko, B., S. Schiess, B. Brands, G. Haile, H. Demmelmair, R. von Kries, und V. Grote, 2010. [Infant feeding practice and later obesity risk. Indications for early metabolic programming]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 53, 666-73.

- Kullen, M. J., L. J. Brady, und D. J. O'Sullivan, 1997. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.* 154, 377-83.
- Kunz, C., S. Rudloff, W. Baier, N. Klein, und S. Strobel, 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 20, 699-722.
- Langhendries, J. P., J. Detry, J. Van Hees, J. M. Lamboray, J. Darimont, M. J. Mozin, M. C. Secretin, und J. Senterre, 1995. 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.* 21, 177-81.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, und D. G. Higgins, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-8.
- Lauer, E., 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 100-2.
- Leblond-Bourget, N., H. Philippe, I. Mangin, und B. Decaris, 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 102-11.
- Lenander-Lumikari, M., 1992. Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H₂O₂ system. *Oral Microbiol. Immunol.* 7, 315-20.
- Liévin, V., I. Peiffer, S. Hudault, F. Rochat, D. Brassart, J. R. Neeser, und A. L. Servin, 2000. *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646-52.
- Lindberg, E., I. Adlerberth, B. Hesselmar, R. Saalman, I. L. Strannegard, N. Aberg, und A. E. Wold, 2004. High rate of transfer of *Staphylococcus aureus* from parental skin to infant gut flora. *J. Clin. Microbiol.* 42, 530-4.
- LoCascio, R. G., P. Desai, D. A. Sela, B. Weimer, und D. A. Mills, 2010. Broad conservation of milk utilization genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as revealed by comparative genomic hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7373-81.
- LoCascio, R. G., M. R. Ninonuevo, S. L. Freeman, D. A. Sela, R. Grimm, C. B. Lebrilla, D. A. Mills, und J. B. German, 2007. Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8914-9.
- LoCascio, R. G., M. R. Ninonuevo, S. R. Kronewitter, S. L. Freeman, J. B. German, C. B. Lebrilla, und D. A. Mills, 2009. A versatile and scalable strategy for glycoprofiling bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides. *Microb. Biotechnol.* 2, 333-42.

- Lönnerdal, B., 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 1537S-1543S.
- Mackie, R. I., A. Sghir, und H. R. Gaskins, 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035S-1045S.
- Madsen, A. L., L. Schack-Nielsen, A. Larnkjaer, C. Molgaard, und K. F. Michaelsen, 2010. Determinants of blood glucose and insulin in healthy 9-month-old term Danish infants; the SKOT cohort. *Diabet. Med.* 27, 1350-7.
- Magne, F., W. Hachelaf, A. Suau, G. Boudraa, K. Bouziane-Nedjadi, L. Rigottier-Gois, M. Touhami, J. F. Desjeux, und P. Pochart, 2008. Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 46, 580-8.
- Malinen, E., J. Mättö, M. Salmitie, M. Alander, M. Saarela, und A. Palva, 2002. PCR-ELISA II: Analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from a consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galacto-oligosaccharide preparation. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 249-58.
- Mantzourani, M., S. C. Gilbert, H. N. Sulong, E. C. Sheehy, S. Tank, M. Fenlon, und D. Beighton, 2009. The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res.* 43, 308-13.
- Marcobal, A., M. Barboza, J. W. Froehlich, D. E. Block, J. B. German, C. B. Lebrilla, und D. A. Mills, 2010. Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *J. Agric. Food Chem.* 58, 5334-40.
- Masco, L., M. Ventura, R. Zink, G. Huys, und J. Swings, 2004. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1137-43.
- Matsuda, K., H. Tsuji, T. Asahara, Y. Kado, und K. Nomoto, 2007. Sensitive quantitative detection of commensal bacteria by rRNA-targeted reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 32-9.
- Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Kado, T. Takada, K. Matsumoto, und R. Tanaka, 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 167-73.
- Matsuki, T., K. Watanabe, J. Fujimoto, Y. Miyamoto, T. Takada, K. Matsumoto, H. Oyaizu, und R. Tanaka, 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5445-51.

- Matsuki, T., K. Watanabe, R. Tanaka, M. Fukuda, and H. Oyaizu, 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4506-12.
- Matthies, A., M. Blaut, and A. Braune, 2009. Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1740-4.
- Mikami, K., H. Takahashi, M. Kimura, M. Isozaki, K. Izuchi, R. Shibata, N. Sudo, H. Matsumoto, and Y. Koga, 2009. Influence of maternal bifidobacteria on the establishment of bifidobacteria colonizing the gut in infants. *Pediatr. Res.* 65, 669-74.
- Mikola, H., M. Waris, and J. Tenovuo, 1995. Inhibition of herpes simplex virus type 1, respiratory syncytial virus and echovirus type 11 by peroxidase-generated hypthiocyanite. *Antiviral Res.* 26, 161-71.
- Miller-Catchpole, R., E. Kot, G. Haloftis, S. Furmanov, and A. Bezkorovainy, 1997. Lactoferrin can supply iron for the growth of *Bifidobacterium breve*. *Nutr. Res.* 17, 205-213.
- Mitsuoka, T., 1992. Intestinal flora and aging. *Nutr. Rev.* 50, 438-46.
- Miyake, T., K. Watanabe, T. Watanabe, and H. Oyaizu, 1998. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol. Immunol.* 42, 661-7.
- Modesto, M., B. Biavati, and P. Mattarelli, 2006. Occurrence of the family bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res.* 40, 271-6.
- Moore, W. E., and L. V. Holdeman, 1974. Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* 27, 961-79.
- Morita, H., A. Nakano, H. Onoda, H. Toh, K. Oshima, H. Takami, M. Murakami, S. Fukuda, T. Takizawa, T. Kuwahara, H. Ohno, S. Tanabe, and M. Hattori, 2011. *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy infant faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2610-5.
- Moro, G., I. Minoli, M. Mosca, S. Fanaro, J. Jelinek, B. Stahl, and G. Boehm, 2002. Dosage-related bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 34, 291-5.
- Mountzouris, K. C., A. L. McCartney, and G. R. Gibson, 2002. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br. J. Nutr.* 87, 405-20.
- Mullié, C., M. F. Odou, E. Singer, M. B. Romond, and D. Izard, 2003. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 129-36.

- Mullié, C., A. Yazourh, H. Thibault, M. F. Odou, E. Singer, N. Kalach, O. Kremp, und M. B. Romond, 2004. Increased poliovirus-specific intestinal antibody response coincides with promotion of *Bifidobacterium longum-infantis* and *Bifidobacterium breve* in infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr. Res.* 56, 791-5.
- Nadkarni, M. A., F. E. Martin, N. A. Jacques, und N. Hunter, 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148, 257-66.
- Nakayama, J., 2010. Pyrosequence-based 16S rRNA profiling of gastrointestinal microbiota. *Bioscience Microflora* 29, 83-96.
- Neu, J., M. Douglas-Escobar, und M. Lopez, 2007. Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr. Clin. Pract.* 22, 174-82.
- Neumeister, B., S. Kastner, S. Conrad, G. Klotz, und P. Bartmann, 1995. Characterization of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial infections in preterm infants. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 856-63.
- Newburg, D. S., 2005. Innate immunity and human milk. *J. Nutr.* 135, 1308-12.
- O'Sullivan, D. J., 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1751-60.
- Ochoa, T. J., und T. G. Clearly, 2004. Lactoferrin disruption of bacterial type III secretion systems. *Biometals* 17, 257-60.
- Oddy, W. H., 2004. A review of the effects of breastfeeding on respiratory infections, atopy, and childhood asthma. *J Asthma* 41, 605-21.
- Ogawa, A., T. Murate, M. Suzuki, Y. Nimura, und S. Yoshida, 1998. Lithocholic acid, a putative tumor promoter, inhibits mammalian DNA polymerase beta. *Jpn. J. Cancer Res.* 89, 1154-9.
- Okamoto, M., Y. Benno, K. P. Leung, und N. Maeda, 2008. *Bifidobacterium tsurumiense* sp. nov., from hamster dental plaque. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 144-8.
- Ouwehand, A. C., 2007. Antiallergic effects of probiotics. *J. Nutr.* 137, 794S-7S.
- Ouwehand, A. C., E. Isolauri, F. He, H. Hashimoto, Y. Benno, und S. Salminen, 2001. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 144-5.
- Owczarzy, R., A. V. Tataurov, Y. Wu, J. A. Manthey, K. A. McQuisten, H. G. Almabrazi, K. F. Pedersen, Y. Lin, J. Garretson, N. O. McEntaggart, C. A. Sailor, R. B. Dawson, und A. S. Peek, 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 36, W163-9.

- Pandey, A., F. Bringel, und J.-M. Meyer, 1994. Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Biotechnol.* 40, 735-739.
- Park, H. K., S. S. Shim, S. Y. Kim, J. H. Park, S. E. Park, H. J. Kim, B. C. Kang, und C. M. Kim, 2005. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *J. Microbiol.* 43, 345-53.
- Park, J. H., J. I. Um, B. J. Lee, J. S. Goh, S. Y. Park, W. S. Kim, und P. H. Kim, 2002. Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol.* 219, 22-7.
- Patelarou, E., C. Girvalaki, H. Brokalaki, A. Patelarou, Z. Androulaki, und C. Vardavas, 2012. Current evidence on the associations of breastfeeding, infant formula, and cow's milk introduction with type 1 diabetes mellitus: a systematic review. *Nutr. Rev.* 70, 509-19.
- Penders, J., C. Thijs, P. A. van den Brandt, I. Kummeling, B. Snijders, F. Stelma, H. Adams, R. van Ree, und E. E. Stobberingh, 2007. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut* 56, 661-7.
- Penders, J., C. Thijs, C. Vink, F. F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P. A. van den Brandt, und E. E. Stobberingh, 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118, 511-21.
- Penders, J., C. Vink, C. Driessen, N. London, C. Thijs, und E. E. Stobberingh, 2005. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 141-7.
- Peterson, L. R., R. U. Manson, S. M. Paule, D. M. Hacek, A. Robicsek, R. B. Thomson, Jr., und K. L. Kaul, 2007. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 45, 1152-60.
- Petschow, B. W., R. D. Talbott, und R. P. Batema, 1999. Ability of lactoferrin to promote the growth of *Bifidobacterium* spp. *in vitro* is independent of receptor binding capacity and iron saturation level. *J. Med. Microbiol.* 48, 541-9.
- Pfaffl, M. W., 2001. Development and validation of an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT-PCR using LightCycler SYBR Green I technology. in S. Meuer, C. Wittwer, und K. Nakagawara, eds.: *Rapid cycle real-time PCR: methods and applications* (Springer, Heidelberg).
- Puccio, G., C. Cajozzo, F. Meli, F. Rochat, D. Grathwohl, und P. Steenhout, 2007. Clinical evaluation of a new starter formula for infants containing live *Bifidobacterium longum* BL999 and prebiotics. *Nutrition* 23, 1-8.
- Raffaelli, B., A. Hoikkala, E. Leppälä, und K. Wähälä, 2002. Enterolignans. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 777, 29-43.

- Requena, T., J. Burton, T. Matsuki, K. Munro, M. A. Simon, R. Tanaka, K. Watanabe, und G. W. Tannock, 2002. Identification, detection, and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2420-7.
- Reuter, G., 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2, 43-53.
- Rinne, M. M., M. Gueimonde, M. Kalliomäki, U. Hoppu, S. J. Salminen, und E. Isolauri, 2005. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43, 59-65.
- RKI, 2011. Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Robert Koch Institut Epidemiologisches Bulletin* Nr. 26.
- Roberfroid, M., G. R. Gibson, L. Hoyles, A. L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl, F. Guarner, F. Respondek, K. Whelan, V. Coxam, M. J. Davicco, L. Léotoing, Y. Wittrant, N. M. Delzenne, P. D. Cani, A. M. Neyrinck, und A. Meheust, 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br. J. Nutr.* 104 Suppl 2, S1-63.
- Roberts, A. K., R. Chierici, G. Sawatzki, M. J. Hill, S. Volpato, und V. Vigi, 1992. Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin: 1. Effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatr.* 81, 119-24.
- Roger, L. C., A. Costabile, D. T. Holland, L. Hoyles, und A. L. McCartney, 2010. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* 156, 3329-41.
- Rolfe, R. D., 1984. Interactions among microorganisms of the indigenous intestinal flora and their influence on the host. *Rev. Infect. Dis.* 6 Suppl 1, S73-9.
- Saavedra, J. M., 2007. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr. Clin. Pract.* 22, 351-65.
- Sakata, H., H. Yoshioka, und K. Fujita, 1985. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur. J. Pediatr.* 144, 186-90.
- Sakata, S., T. Tonooka, S. Ishizeki, M. Takada, M. Sakamoto, M. Fukuyama, und Y. Benno, 2005. Culture-independent analysis of fecal microbiota in infants, with special reference to *Bifidobacterium* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 243, 417-23.
- Sartor, R. B., 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577-94.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, A. D. Akkermans, M. Saarela, und W. M. de Vos, 2001a. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504-13.

- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, A. D. Akkermans, M. Saarela, and W. M. de Vos, 2001b. Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal *Bifidobacterium* populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 227-31.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, C. F. Favier, J. Doré, C. A. Edwards, and W. M. De Vos, 2002. Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. *Microb. Ecol. in Health and Dis.* 14, 97-105.
- Satokari, R. M., E. E. Vaughan, H. Smidt, M. Saarela, J. Mättö, and W. M. de Vos, 2003. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. *Syst. Appl. Microbiol.* 26, 572-84.
- SCF, Scientific committee on food, 2003. Report of the scientific committee on food on the revision of essential requirements of infant formulae and follow-on formulae. *European commission*.
- Schaible, U. E., and S. H. Kaufmann, 2004. Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 946-53.
- Schell, M. A., M. Karmirantzou, B. Snel, D. Vilanova, B. Berger, G. Pessi, M. C. Zwahlen, F. Desiere, P. Bork, M. Delley, R. D. Pridmore, and F. Arigoni, 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14422-7.
- Schmelzle, H., S. Wirth, H. Skopnik, M. Radke, J. Knol, H. M. Böckler, A. Brönstrup, J. Wells, and C. Fusch, 2003. Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 36, 343-51.
- Scholtens, P. A., P. Alliet, M. Raes, M. S. Alles, H. Kroes, G. Boehm, L. M. Knippels, J. Knol, and Y. Vandenplas, 2008. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. *J. Nutr.* 138, 1141-7.
- Schrezenmeir, J., and M. de Vrese, 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 361S-364S.
- Schulze, J., U. Sonnenborn, T. Ölschläger, and W. Kruis, 2008. Mikroökologie des Menschen. in *Probiotika* (Hippokrates, Stuttgart).
- Schulze, J., and H. J. Zunft, 1991. [Lactose--a potential dietary fiber. The regulation of its microecological effect in the intestinal tract. 1. Problems, state of knowledge and methods]. *Nahrung* 35, 849-66.
- Sela, D. A., J. Chapman, A. Adeuya, J. H. Kim, F. Chen, T. R. Whitehead, A. Lapidus, D. S. Rokhsar, C. B. Lebrilla, J. B. German, N. P. Price, P. M. Richardson, and D. A. Mills, 2008. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

- reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18964-9.
- Sela, D. A., und D. A. Mills, 2010. Nursing our microbiota: molecular linkages between bifidobacteria and milk oligosaccharides. *Trends Microbiol.* 18, 298-307.
- Simpson, P. J., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, und C. Stanton, 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp. nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp. nov., isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 401-6.
- Slade, H. B., und S. A. Schwartz, 1987. Mucosal immunity: the immunology of breast milk. *J. Allergy Clin. Immunol.* 80, 348-58.
- Solano-Aguilar, G., H. Dawson, M. Restrepo, K. Andrews, B. Vinyard, und J. F. Urban, Jr., 2008. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6338-47.
- Stark, P. L., und A. Lee, 1982. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* 15, 189-203.
- Steele, W. F., und M. Morrison, 1969. Antistreptococcal activity of lactoperoxidase. *J. Bacteriol.* 97, 635-9.
- Strokes, C. R., J. F. Soothill, und M. W. Turner, 1975. Immune exclusion is a function of IgA. *Nature* 255, 745-746.
- Sullivan, A., C. Edlund, und C. E. Nord, 2001. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect. Dis.* 1, 101-14.
- Summerton, J., N. Goeting, G. A. Trotter, und I. Taylor, 1985. Effect of deoxycholic acid on the tumour incidence, distribution, and receptor status of colorectal cancer in the rat model. *Digestion* 31, 77-81.
- Suskovic, J., B. Kos, J. Beganovic, A. Lebos Pavunc, K. Habjanic, und S. Matosic, 2010. Antimicrobial activity – The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 296-307.
- Tonooka, T., S. Sakata, M. Kitahara, M. Hanai, S. Ishizeki, M. Takada, M. Sakamoto, und Y. Benno, 2005. Detection and quantification of four species of the genus *Clostridium* in infant feces. *Microbiol. Immunol.* 49, 987-92.
- Tullus, K., B. Aronsson, S. Marcus, und R. Möllby, 1989. Intestinal colonization with *Clostridium difficile* in infants up to 18 months of age. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8, 390-3.
- Turnbaugh, P. J., M. Hamady, T. Yatsunencko, B. L. Cantarel, A. Duncan, R. E. Ley, M. L. Sogin, W. J. Jones, B. A. Roe, J. P. Affourtit, M. Egholm, B. Henrissat, A. C. Heath, R. Knight, und J. I. Gordon, 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480-4.

- Turroni, F., E. Foroni, P. Pizzetti, V. Giubellini, A. Ribbera, P. Merusi, P. Cagnasso, B. Bizzarri, G. L. de'Angelis, F. Shanahan, D. van Sinderen, und M. Ventura, 2009a. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1534-45.
- Turroni, F., J. R. Marchesi, E. Foroni, M. Gueimonde, F. Shanahan, A. Margolles, D. van Sinderen, und M. Ventura, 2009b. Microbiomic analysis of the bifidobacterial population in the human distal gut. *ISME J.* 3, 745-51.
- van Oudijk, J., I. Kull, M. P. Borres, P. Brandtzaeg, U. Edberg, L. A. Hanson, A. Høst, M. Kuitunen, S. F. Olsen, S. Skerfving, J. Sundell, und S. Wille, 2003. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* 58, 833-43.
- Ventura, M., C. Canchaya, A. Del Casale, F. Dellaglio, E. Neviani, G. F. Fitzgerald, und D. van Sinderen, 2006. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2783-92.
- Ventura, M., C. Canchaya, V. Meylan, T. R. Klaenhammer, und R. Zink, 2003. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6908-22.
- Ventura, M., C. Canchaya, D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald, und R. Zink, 2004a. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the *atp* (*atpBEFHAGDC*) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3110-21.
- Ventura, M., C. Canchaya, R. Zink, G. F. Fitzgerald, und D. van Sinderen, 2004b. Characterization of the *groEL* and *groES* loci in *Bifidobacterium breve* UCC 2003: genetic, transcriptional, and phylogenetic analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6197-209.
- Ventura, M., D. van Sinderen, G. F. Fitzgerald, und R. Zink, 2004c. Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 205-23.
- Ventura, M., und R. Zink, 2003. Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes and restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region sequences supply additional tools for discriminating *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7517-22.
- Ventura, M., R. Zink, G. F. Fitzgerald, und D. van Sinderen, 2005. Gene structure and transcriptional organization of the *dnaK* operon of *Bifidobacterium breve* UCC 2003 and application of the operon in bifidobacterial tracing. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 487-500.

- Vlieger, A. M., A. Robbroch, S. van Buuren, J. Kiers, G. Rijkers, M. A. Benninga, und R. te Biesebeke, 2009. Tolerance and safety of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in combination with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in a prebiotic-containing infant formula: a randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 102, 869-75.
- von Ah, U., V. Mozzetti, C. Lacroix, E. E. Kheadr, I. Fliss, und L. Meile, 2007. Classification of a moderately oxygen-tolerant isolate from baby faeces as *Bifidobacterium thermophilum*. *BMC Microbiol.* 7, 79.
- von Wintzingerode, F., U. B. Göbel, und E. Stackebrandt, 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 213-29.
- Voth, D. E., und J. D. Ballard, 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 247-63.
- Vuong, C., und M. Otto, 2002. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes Infect.* 4, 481-9.
- Walter, J., C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro, und W. P. Hammes, 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2578-85.
- Ward, R. E., M. Ninonuevo, D. A. Mills, C. B. Lebrilla, und J. B. German, 2007. *In vitro* fermentability of human milk oligosaccharides by several strains of bifidobacteria. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1398-405.
- Yasui, H., N. Nagaoka, A. Mike, K. Hayakawa, und M. Ohwaki, 1992. Detection of *Bifidobacterium* strains that induce large quantities of IgA. *Microb. Ecol. in Health and Dis.* 5, 155-162.
- Yildirim, Z., und M. G. Johnson, 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J. Food Prot.* 61, 47-51.
- Yin, X., J. R. Chambers, K. Barlow, A. S. Park, und R. Wheatcroft, 2005. The gene encoding xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase (*xfp*) is conserved among *Bifidobacterium* species within a more variable region of the genome and both are useful for strain identification. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 251-7.
- Youn, S. Y., J. M. Seo, und G. E. Ji, 2008. Evaluation of the PCR method for identification of *Bifidobacterium* species. *Lett. Appl. Microbiol.* 46, 7-13.
- Young, S. L., M. A. Simon, M. A. Baird, G. W. Tannock, R. Bibiloni, K. Spencely, J. M. Lane, P. Fitzharris, J. Crane, I. Town, E. Addo-Yobo, C. S. Murray, und A. Woodcock, 2004. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11, 686-90.

-
- Zhu, L., W. Li, und X. Dong, 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium thermacidophilum* subsp. *porcinum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1619-23.
- Zhurina, D., A. Zomer, M. Gleinser, V. F. Brancaccio, M. Auchter, M. S. Waidmann, C. Westermann, D. van Sinderen, und C. U. Riedel, 2011. Complete genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17. *J. Bacteriol.* 193, 301-2.
- Zivkovic, A. M., und D. Barile, 2011. Bovine milk as a source of functional oligosaccharides for improving human health. *Adv Nutr* 2, 284-9.
- Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, W. M. Akkermans-van Vliet, A. G. Visser, und W. M. de Vos, 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. in Health and Dis.* 13, 129-134.
- Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, und W. M. De Vos, 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3854-9.

B. catenulatum
B. pseudocatenulatum
B. dentium
B. adolenscentis
B. angulatum
B. bifidum
B. thermophilum
B. breve
B. longum
B. animalis
B. pseudolongum
B. gallicum

--GGKATGGSASACYACGGCGACRGTGTTGCCACAGTCCCTGGTGAC 48
 --GGWATGGSASACYAGGGGACMGITGCTGYCSWGKCCCYKYGGMM 48
 -TGMGAYGGACACACACCGCMACYGTGCTGGCCAGICTTGGIGGAI 48
 CAGCGACGGCACCAACCGCAACCGTGTGGCCAGTCCCTGGTGAC 300
 -TGGGACGGAAACAGACAGCGCAACTGTGTGGCTCAGTCCCTCGTGAC 49
 --GGGACGGAAACMACYACCGCMACSTGTGGCCAGTCCCTCGTGAC 48
 --GGRGATGGRACYACKACGGCAACGGTGTGGCCAGTCCCTGGTGAC 48
 -----GGWACMACMACYGCRCASGTGTGGCCAGTCCCTGGTTCAC 42
 -----GCDACNGTGTGCTCAGTCCCTGGTTCAC 30
 -----CNGTRCTTGGHMAGTCCYTCGTGCAI 26
 --GGBGATGGBACDACNACNGCNACVGTSTGSCMAGTSCCTYGTGAC 48
 -TGGTGACGGSACYACRACGTGCKACCGTGTGGCTCAGGCTCTCGTGAC 49
 *

B. catenulatum
B. pseudocatenulatum
B. dentium
B. adolenscentis
B. angulatum
B. bifidum
B. thermophilum
B. breve
B. longum
B. animalis
B. pseudolongum
B. gallicum

GAAGCCTGAAGAACGTCAACCGCGGTTCCAACCCAAATCGCTCTGGTGC 98
 GAAGCCTGAAGAASGTCAACCGYCGGTCCAACCCGATCGCTKTGGTGC 98
 GAAGCCTGAAGAACGTCAACCGCGGTTCCAACCCGATCGCCTGGTGC 99
 GAGGCTGAAGAACGTCAACCGCGGTTCCAACCCGATCGGCTGGTGC 350
 GAAGCCTGAAGAACGTGTGGCGGTTCCAACCCGATTTGGCTGGCGG 99
 GAAGCCTGAAGAACGTTGTGGCGGTTCCAACCCGATCGGCTGGTGC 98
 GAAGCCTGAAGAACGTGTGGCGGTTCCAACCCGATTTGGCTGGTGC 98
 GAGGCTGAAGAACGTGTGGCGGTTCCAACCCGATCGGCTGGTGC 92
 GAGRGTGAAGAAYGTGGTGGCGGTTCCAACCCGATCGCCTGGTGC 80
 GAGGCTGAAGAACGTGTGGCGGTTCCAACCCGATCGGCTGGTGC 76
 GAAGCCTCAAGAAYGTGGCGGTTCCAACCCGATCGGCTGGCGG 98
 GAAGGCTGAAGAACGTGTGGCGGTTCCAACCCGATCGGCTGGCGG 99
 *

B. catenulatum
B. pseudocatenulatum
B. dentium
B. adolenscentis
B. angulatum
B. bifidum
B. thermophilum
B. breve
B. longum
B. animalis
B. pseudolongum
B. gallicum

TGGTATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 148
 KGGTATCGAGAAGGCTTCGAAGCCATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 148
 TGGTATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 149
 TGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 400
 CGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 149
 CGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 148
 CGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 148
 CGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 142
 CRGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 130
 CGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 126
 TGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 148
 TGGATCGAGAAGGCTTCGAGGCTATCGTCAAGGAGCTATCGCAGCTG 149
 *

B_den-f

B_cat-f
B_pcat-f

B_the-f
B_bre-f

B_plon-f
B_gal-f

<i>B. catenulatum</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTGGCCACCACCGAACGATTTC	198
<i>B. pseudocatenulatum</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGYCTACCGCAACGATTTC	198
<i>B. dentium</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATCTCC	199
<i>B. adolescentis</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATCTCC	450
<i>B. angulatum</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	199
<i>B. bifidum</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	198
<i>B. thermophilum</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	198
<i>B. breve</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	192
<i>B. longum</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	180
<i>B. animalis</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	176
<i>B. pseudolongum</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	198
<i>B. gallium</i>	CCAAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGTCCACCGAACGATTTC	199
	* * * * *	
<i>B. catenulatum</i>	GCAGCCGATCCGGAAGTCGGYGAGAGATCGCTGAGGCGCTGGACAAGGT	248
<i>B. pseudocatenulatum</i>	GCCGCCGATCCGGAAGTCGGCGAGAGATCGCCGAAGCTTTGACAAGGT	248
<i>B. dentium</i>	GCCGCCGATCCGGAAGTCGGCGAGAGATCGCCGAAGCTTTGACAAGGT	249
<i>B. adolescentis</i>	GCCCTGATCCGGAAGTCGGCGAGAGATCGCCGAAGCTTTGACAAGGT	500
<i>B. angulatum</i>	GCCGCCGATCCGGAAGTCGGCGAGAGATCGCCGAAGCTTTGACAAGGT	249
<i>B. bifidum</i>	GCAGCCGATCCGGAAGTCGGCGAGAGATCGCCGAAGCTTTGACAAGGT	248
<i>B. thermophilum</i>	GCTGCTGAYCTGAGTCGGYGAGAGATCGYGARCCGTYGACAAGGT	248
<i>B. breve</i>	GCTGCTGAYCTGAGTCGGYGAGAGATCGYGARCCGTYGACAAGGT	242
<i>B. longum</i>	GCCGYGACCTGAGTCGGCGAGAGAYCGYTGAGGCTTTGACAAGGT	230
<i>B. animalis</i>	GCAGGTGACCCGAGGTGGCGAGAGATCGCCGAGGCTTCGACAAGGT	226
<i>B. pseudolongum</i>	GCMCCGAYCCCGAGGTGGCGAGAGATCGCCGAGGCTTCGACAAGGT	248
<i>B. gallium</i>	GCTGCTGACCCGAGGTTGGCGAGAGATTTGCCGAAGCGCTCGACAAGGT	249
	** * * * *	
<i>B. catenulatum</i>	TGGCCAGGATGGTGTGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGTTTGG	298
<i>B. pseudocatenulatum</i>	TGGCCAGGACGGNGTCNTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. dentium</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
<i>B. adolescentis</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	550
<i>B. angulatum</i>	TGGCCAGGACGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
<i>B. bifidum</i>	CGGTGAGGACGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. thermophilum</i>	CGGCACGGATGGYGTGTCGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. breve</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	292
<i>B. longum</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	280
<i>B. animalis</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	276
<i>B. pseudolongum</i>	YGGCCAGGATGGYGTGTCGACCCGTCGARGACAAACACCGTTTCGGYCTSG	298
<i>B. gallium</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
	** * * * *	
<i>B. catenulatum</i>	TGGCCAGGATGGTGTGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGTTTGG	298
<i>B. pseudocatenulatum</i>	TGGCCAGGACGGNGTCNTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. dentium</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
<i>B. adolescentis</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	550
<i>B. angulatum</i>	TGGCCAGGACGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
<i>B. bifidum</i>	CGGTGAGGACGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. thermophilum</i>	CGGCACGGATGGYGTGTCGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. breve</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	292
<i>B. longum</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	280
<i>B. animalis</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	276
<i>B. pseudolongum</i>	YGGCCAGGATGGYGTGTCGACCCGTCGARGACAAACACCGTTTCGGYCTSG	298
<i>B. gallium</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
	** * * * *	
<i>B. catenulatum</i>	TGGCCAGGATGGTGTGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGTTTGG	298
<i>B. pseudocatenulatum</i>	TGGCCAGGACGGNGTCNTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. dentium</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
<i>B. adolescentis</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	550
<i>B. angulatum</i>	TGGCCAGGACGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
<i>B. bifidum</i>	CGGTGAGGACGGGTCGTGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. thermophilum</i>	CGGCACGGATGGYGTGTCGACCCGTCGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	298
<i>B. breve</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	292
<i>B. longum</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	280
<i>B. animalis</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	276
<i>B. pseudolongum</i>	YGGCCAGGATGGYGTGTCGACCCGTCGARGACAAACACCGTTTCGGYCTSG	298
<i>B. gallium</i>	CGGCACGGATGGGTCGTGACCCGTTGAGGACAAACACCGTTTCGGCTTG	299
	** * * * *	

<i>B. catenulatum</i>	TGCGCGAACTGGTTCATGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCATCGCCGAG	498
<i>B. pseudocatenulatum</i>	TGCGCGAGCTGGTTCATGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCATCGCTGAA	498
<i>B. dentium</i>	TGCGCGAGCTGGTTCATGAAGACCCGGAAGCCGCTGATGATCATCGCCGAG	499
<i>B. adolescentis</i>	TGCGCGAGTTGGTTATGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCATCGCTGAG	750
<i>B. angulatum</i>	TGCGCGAAUUGTGTAGTGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCATCGCCGAA	499
<i>B. bifidum</i>	TGCGCGAGCTCGTTCATGAAGTCCGCAAGCCGCTGCTGATCATCGCCGAG	498
<i>B. thermophilum</i>	TKGCTGACYTGGTTCATGAAGACCCGCTCCGCTGCTGATCGTGGTGAR	498
<i>B. breve</i>	TGCGCGAGCTGGTTCATGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCATCGCTGAG	492
<i>B. longum</i>	TGGCKKAGCTGGTCRYSARGACCCRCAMGMCYGYGRYWTCSCTGAG	480
<i>B. animalis</i>	TGCGCGAACTGGTGTAGTGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCGTGGCCGAG	476
<i>B. pseudolongum</i>	TGCGCGARCTCGTGTAGTGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCATCGCCGAG	498
<i>B. gallicum</i>	TGCGCGAGCTCGTTCATGAAGACCCGGAAGCCGCTGCTGATCATCGCCGAG	499
	* * * * *	* * * * *
<i>B. catenulatum</i>	GACGTCGACGGGAGGCTTCGCGACCCTGATCCTGAACAACATCCGTGG	548
<i>B. pseudocatenulatum</i>	GACGTTGATGGGAGGCTTCGCGACCCTTGTTCGAAACAACATCCGCGG	548
<i>B. dentium</i>	GACGTTGACGGGAGGCTTCGCGACCCTGATCCTGAACAACATCCGTGG	549
<i>B. adolescentis</i>	GACGTTGACGGGAGGCTTCGCGACCCTGATCCTGAACAACATCCGCGG	800
<i>B. bifidum</i>	GACGTTGACGGGAGGCTTCGCGACCCTGATCCTGAACAACATCCGTGG	549
<i>B. thermophilum</i>	GACGTCGACGGGAGGCTTCGCGACCCTATCCTGAACAAGATCCGCGG	548
<i>B. breve</i>	GAYTCGACGGYAGCCGTCGCGACCCTGATCCTGAACAACATCCGCGG	548
<i>B. longum</i>	GATGTTGACGGGAGGCTTCGCGACCCTGATCCTGAACAACATCCGTGG	542
<i>B. animalis</i>	GACGTCGAYGGGAAACACTGCGCACCTGATCCTGAWCRACATCCGTGR	530
<i>B. pseudolongum</i>	GATGTCGATGGGAGGRCCTGCCCAGCTGATCCTCAACAACATCCGTGG	526
<i>B. gallicum</i>	GACGTTGAYGGGAAACACTGCGCACCTGATCCTSAACAACATCCGTGG	548
	GATGTTGATGGGAGGCTTCGCGACCCTGATCCTGAACAACATCCGTGG	549
	* * * * *	* * * * *
<i>B. catenulatum</i>	CACCTTCAAGTCCTGCGCGGTAAAGCMCCSGGCTTCGGYGA	590
<i>B. pseudocatenulatum</i>	CACCTTCAAGTCCTGCGCGGTAAAGCCCCYGGBTYGGSR	589
<i>B. dentium</i>	CACGTTCAAGTCCTGCGCGGTSAARGCTCCKGGYTCGGSG	590
<i>B. adolescentis</i>	CACCTTCAAGTCCTGCGCGGTCAAGCTCCGGCTTCGGCGACCGCGTA	850
<i>B. angulatum</i>	CACCTTCAAGTCCTGCGCGGTCAAGCACCTGGCTTTGGTG	590
<i>B. bifidum</i>	CACCTTCAACTCCTGCGCGGTCAARGCMCCGGYTCGGCGA	590
<i>B. thermophilum</i>	CACCTTCAACACTGCGCAGTYAARGCKCCGGMITYGGYGA	590
<i>B. breve</i>	TACCTTCAAGTCCTGCGGTCAARGCWCCSGGSTTCGGWGA	584
<i>B. longum</i>	CACCTTYAAGTCCTGSGCNGTN	552
<i>B. animalis</i>	CACCTTCAASWCTGCGCAGTSAARGCYCCBGGBTTCGGNG	567
<i>B. pseudolongum</i>	CACGTTCAAGTCCTGCGCAGTNAARGCBCCYGGNTYGGYGA	590
<i>B. gallicum</i>	CACGTTCAAGTCCTGCGCAGTCAARGCWCCSGGSTTCGGCGA	591
	* * * * *	* * * * *

B_ang-r**B_lon-r****B_ani-r**

Abbildung A1. Multipler Sequenzabgleich von *groEL*-Sequenzen der zu untersuchenden Bifidobakterienspezies (**Tab. 2.5**). Die Bindesequenzen der speziespezifischen Oligonukleotid-Primer sind unterstrichen. Für *B. adolescentis* konnte die komplette Gensequenz für den Sequenzvergleich eingesetzt werden. Der überlappende Bereich aller Sequenzen befindet sich zwischen den Positionen von ~250-840 der kompletten *groEL*-Gensequenz.

***B. adolescentis* ATCC 15703^T** (GenBank Akzessionsnr.: AP009256)

ATGGCAAAGATGATTGCATATGACGACGAAAGCTCGTCAGGGAATGCTCGCGGGTCTCGAC 60
 AAGCTCGCTGACACCGTCAAGGTCACCCCTGGTCCGAAGGGCCGCAATGTGGTGCTTGAC 120
 AAGACCTACGGCGCTCCGACCATCACCAACGATGGCGTTTCCATCGCAAAGGAAATCGAT 180
 CTGGACGATCCGTATGAGCGTATCGGCGCCGAACGGTCAAGGAAGTCGCCAAGAAGACC 240
 GATGACGTCGAGGGCAGCGCACCACCACCCAACCGTGCTGGCCCAGTCCCTGGTGAC 300
 GAGGGTCTGAAGAACGTCACCGCCGGTTCCAACCCGATCGCGCTGCGTGTGGCATCGAG 360
 AAGGCCGCCGACCCATCGTCAAGGAACCTCGTCGACGCGCCAAGGACGTTGAGACCAAG 420
B_ado-std-f B_ado-f
GATCAGATCGCTGCCACCGCAACGATCTCCGCCGCTGATCCGGAAGTCGGCGAGAAGATC 480
 GCCGAAGCTCTGGACAAGGTCGGCCAGGATGGCGTCGTGACCGTCGAGGACAACAACCGC 540
 TTCGGTCTTGACCTTGACTTCAACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCGCTCCG 600
 TACTTCGTGACCAACGCCGAGGACCAGACCCCGTTCTCGAGGATCCGTACATCCTCCTG 660
 B_ado-r
 ACCTCCGGCAAGCTGAGCTCCCAGCAGGATGTCGTCCACATCGCCGAGTTGGTTATGAAG 720
B_ado-std-r
ACCGGCAAGCCGCTGCTGATCATCGCTGAGGACGTTGACGGCGAGGCTCTGCCACCCTG 780
 ATTCTGAACAACATCCCGGGCACCTTCAAGTCTGCGCCGTCAAGGCTCCGGGCTTCGGC 840
 GACCGCCGTAAGGCCATGCTGCAGGATATGGCCATCCTGACCGGTGCCAGGTGGTGTCC 900
 GATGAGCTGGGCTGAAGCTCGACTCCGTCGACATGTCCGTGCTTGGCACCGCCAAGAAG 960
 GTCATCGTCTCAAGGATGAGACCACCATCGTGTCCGGTGGCGGCTCCAAGGAGGACGTG 1020
 GCCGCTCGCGTCGTCAGATCCGTGGCGAGATCGCCAACACCGATTCCGATTACGATCGC 1080
 GAGAAGCTGCAGGAGCGCTGGCCAAGCTGGCCGGCGGTGTCGCCGTCATCAAGGTCCGC 1140
 GCTGCCACCGAGTTGAGGCCAAGGAACGCAAGCACCGCATCGAGGATGCCGTGCGCAAC 1200
 GCCAAGGCCGCTATCGAGGAAGGTCGTGTCGCCGGCGGCGGTGTCGCCCTGATCCAGGCT 1260
 GCCGCCAAGGCCAAGGACGACGTCGAAGCTCGAAGGCGACGAGGCCACCGGTGCCGCGATC 1320
 GTGTTCCGTGCCGTCGAAGCCCCGATCAAGCAGATCGCCGAAAACGCTGGCCTGTCCGGC 1380
 GACGTGGTGATCGACAAGGTCCGCTCCCTGCCGACGGCCAGGGCCTGAACGCGGCCACC 1440
 AACGAGTACGAGGACCTGCTGGCCGACGGCGTACCGACCCGGTCAAGGTGACTCGTTCC 1500
 GCTCTGCAGAACGCAGCTTCCATCGCTGGACTGTTCCCTGACCACCGAAGCCGTGGTGGCC 1560
 AACAAGCCGGAACCGCCGGCAGCCGCTCCGGCAGCTGGCGCCGACATGGGCTACTGA 1617

***B. angulatum* JCM 7096^T** (GenBank Akzessionsnr.: AF240568)

TGGGGACGGAACGACGACGGCAACTGTGCTGGCTCAGTCCCTCGTGCACGAAGGCCTGAA 60
 GAACGTGGTCGCCGGCTCCAACCCGATTGCGCTGCGCCGCGCATTGAAAAGGCCGCCGA 120
 CGCCATCGTCAAGGAACTCGTCGACGCGCCGAAGGACGTCGAGACCAAGGATCAGATCGC 180
 TGCCACCGCAACGATTTCCGCCGCCGATCCCGAGGTTGGCGAGAAGATCGCCGAAGCCCT 240
 GGACAAGGTTGGCCAGGACGGCGTCGTGACCGTTGAGGACAACAACCGCTTCGGCCTGGA 300
 TCTGGACTTACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCGCCCCGTACTTCGTAC 360
B_ang-std-f
 CAACGCCGAAGATCAGACCGC**AGTGCTCGAAGACCCGTACATCCT**GCTGACCTCCAGCAA 420
 B_ang-f
 GCTGTCTCCAGCAGGACGTGGTCCACATCGCCGAAATGGTGATGAAGACCGGCAAGCC 480
 B_ang-r **B_ang-std-r**
 GCTGCTGATCATCGCCGAAGACGTTGACGGCGAAGCGCTGCC**GACCCGTGATCCTGAACAA** 540
CATCCGTGGCACCTTCAAGTCTGCGCGGTCAAGGCACCTGGCTTTGGTG 590

***B. animalis* ssp. *lactis* DSM 10140^T (GenBank Akzessionsnr.: AY004282)**

ATGGCAAAGATCATTGAATACGATGAGGAAGCTCGTCAGGGTATGCTCGCCGGTCTGGAT 60
AAGCTGGCCGATAACCGTCAAGGTGACGCTTGGTCCCAAGGGCCGCAACGTCGTGCTTGAC 120
AAGACCTATGGCGCGCCGACCATCACCAACGATGGCGTTTTCGATCGCCAAGGAGATCGAT 180
CTTGAGGATCCGTTGAGCGCATTGGTGCCGAACGGTGAAGGAAGTGGCCAAGCGCACC 240
GATGATGTCGCCGGCGATGGCACCACCACCCAACTGTACTTGACAGTCCCTCGTGAT 300
GAGGGTCTGAAGAACGTTGGTGGCCGGATCCAATCCGATTGCCCTGCGCCGGCGCATCGAG 360
AAGGCTTCCGACGCTCTCGTCAAGCAGCTTGTGCTTCCGCGAAGCCGGTGGAGACCAAG 420
GAACAGATTGCTGCAACCGLAACGATTTCCGCAGGTGACCCCGAGGTGGGCGAGAAGATC 480

B_ang-std-f

GCCGAGGCTCTCGACAAGGTCCGGACAGGATGGCGT**CCTCACCGTCTGAAGACAACA**CCGC 540
TTCGGCCTCGATCTCGATTTTCAACCAGGGGCATGCGCTTCGACAAGGGTTATATTTCACCC 600

B_ani-f

TACTTCGT**CACCAATGCGGAAGACC**GACGGCCGTGCTCGACGCCCGTACATTCTGCTC 660
ACCTCGAGCAAGGTCTCTCTCGCAGCAGGATGTGGTCCACATCGCCGAACCTGGTGATGAAG 720

B_ani-r

ACCGGCAAGCCGTTGCTGATCGTGGCCGAGGATGTCGATGGCGAGGCACTGCC**CCACGCTG** 780

B_ang-std-r

ATTCTCAACAACATCCGTGGCACCTTCAAGTCCTCGCGCCGTCAAGGCTCCGGGCTTCGGT 840
GACCGCCGCAAGGCCATGCTGCAGGATATGGCGATTCTGACCGCGGTCTAGGTCGTCTCG 900
GAGGATCTGGGCCTCAAGCTCGATTCCATCGACCTGTCCGTGTTCCGGCACCGCCAAGAAG 960
GTCATTGTCTCCAAGGATGAGACCACCATCGTGTCCGGTGGCGGCTCCAAGGAGGACGTG 1020
GCCGCACGCGTCGCCAGATTCGCGCCGAGATCGAGAAGACCGATTCCGATTACGATCGT 1080
GAGAAGCTGCAGGAGCGTTTGCTAAGCTGGCAGGTGGCGTCCCGTTCATCAAGGTCCGC 1140
GCAGCCACCGAGGTCGAGGCCAAGGAGCGCAAGCACCCTGACTGAAGATGCCGTGCGCAAC 1200
GCCAAGCCGCCATCGAAGAGGGTCTGGTTCCGGGCGCGGCGTCCGACTGGTGCAGGCT 1260
GCCGAAAAGGTTGAGAAGGACTTCAACCTGAAGGCGACGAGGCCACCGGTGCCGCAATC 1320
GTCTTCTCGGGCATCGAGGCTCCGATTAAGCAGATCGCCGAAAATGCAGGTCCTCTTGGC 1380
GCCGTGGTGATCGACAAGGTTTGGTTCCTGCCGTGAGGGTGGGGCTTCAATGCGGCAACC 1440
GACACCTATGAGGATCTCATGGCCGCGGTTGTGACCGATCCTGTCAAGGTGACTCGTTCT 1500
GCTTTGCAGAATGCGGCCATCGCGGGTCTGTTCCTGACGACCGAAGCGGTTGTGCGC 1560
AACAAGCCGGAGCCGGCAGCGGCAACCGGCGCCGGCCACAACATGGGTTACTGA 1614

***B. bifidum* JCM 1255^T (GenBank Akzessionsnr.: AY004280)**

GGCGACGGAACAACACTACCGCAACGGTGGTGGCCCAGTCCCTCGTGACGAAGGCCTGAAG 60
AACGTTGTCGCCGGCTCCAACCCGATCGCGCTGCGTCCGCGCATCGAGAAGGCCACCAC 120

B_bif-std-f

ACCATCGTCAAGGAACTGGTCCGCCCG**CAAGGACGTGGAGACCAAG**GACCAGATCGCC 180

B_bif-f

GCCACCGCCACGATCTCCGAGCCGACCCGAGGTTGGCGAGAAGATCGCCGAGGCTCTG 240
GACAAGGTCGGTCAGGACGGCGTCGTGACCGTCCGAGGACAACAACCGCTTCGGCTTGAC 300
CTTGAGTTACCGAGGGCATGCGTTTCCGACAAGGGCTACATCGCCCCGTACTTCGTGACC 360

B_bif-r

AACCGGACGACCAGACCGGGTTCTTGAAGGATCCGTACATCCT**CCTGACCTCCGGCAAG** 420
GTTTCCAGCCAGCAGGACGTCGTCCACATCGCCGAGCTCGTCATGAAGTCCGGCAAGCCG 480

B_bif-std-r

CTGCTGATCATCGCCGAGGACGTCGACGGCGAGGCGCTG**CGACCCTCATCTGAACAAG** 540
ATCCGCGGCACCTTCAACTCCTGCGCCGTCAAAGCACCCGGTTTCGGCGA 590

***B. breve* DSM 20213^T** (GenBank Akzessionsnr.: AF240566)

GGAACAACAACACTGCGACGGTGCTCGCCCAGTCCCTGGTTCACGAGGGTCTGAAGAACGTG 60
B_bre-std-f
 GTCGCCGGTTCCAACCCGATCGCGCTGCGTTCGGCCATTGAGAAGG**CCACCGAGGTCATC** 120
 B_bre-f
GTCAAGGAGCTCGTTCGTTGCCGCAAGGACGTTGAGACCAAGGACCAGATTGCTGCTACC 180
 GCCACCATCTCCGCTGCTGACCCCGAGGTCGGCGAGAAGATCGCTGAGGCTCTGGACAAG 240
 GTCGCCAGGATGGCGTTGTGACCGTTGAAGATAACAACCGCTTCGGTCTGGACCTCGAC 300
 TTCACCGAGGGCATGCGTTTCGACAAGGGCTACATTGCCCGTACTTCGTCACCAACGCT 360
 B_bre-r **B_bre-std-r**
 GACGACCAGACCGCCGTGCTCGAGGATCCGTACATTCTGTTGACCTCCGG**CAAGGTCCTC** 420
TCCCAGCAGGACATCGTGCACGTGGCCGAGCTGGTCATGAAGACCGGCAAGCCGCTGCTG 480
 ATCATCGCTGAGGATGTTGACGGCGAGGCTCTGCCGACCCTGATTCTGAACAACATTCTG 540
 GGTACCTTCAAGTCCTGCGCTGTCAAAGCACCCGGGTTTCGGAGA 584

***B. catenulatum* JCM 1194^T** (GenBank Akzessionsnr.: AY004272)

GGGGATGGCACCACACTACGGCGACGGTGCTTGCCACAGTCCCTGGTGCACGAAGGCCTGAAG 60
B_cat-std-f
 AACGTCACCGCCGGTTCCAACCCAATCGCTCTG**GTCGTTGGTATCGAGAAG**GCTTCCGAG 120
 B_cat-f
GCTATCGTCAAGGAGCTCATCGCAGCTGCCAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGCT 180
 GCCACCGCAACGATTTCCGACGCCGATCCGGAAGTCGGTGAGAAGATCGCTGAGGCGCTG 240
 B_cat-r
 GACAAGGTTGGCCAGGATGGTGTGACCGTTGAGGACAACAACCG**TTTCGGTTTGAT** 300
B_cat-std-r
 CTGGACTTACCCGAAGGCATG**CGTTTTGACAAGGGGCTA**CATTGCCCGTACTTCGTGACC 360
 AACGCCGAAGATCAGACCCGAGTGCTCGAAGAACCGTACATCCTGCTGACCTCCGGCAAG 420
 CTGAGCTCCAGCAGGACGTCGTACACATCGCCGAACGTTGATGAAGACCGGCAAGCCG 480
 CTGCTGATCATCGCCGAGGACGTCGACGGCGAGGCTCTGCCGACCCTGATCCTGAACAAC 540
 ATCCGTGGCACCTTCAAGTCCTGCGCCGTTAAAGCACCCGGGCTTCGGTGA 590

***B. dentium* JCM 1195^T** (GenBank Akzessionsnr.: AF240572)

B_den-std-f B_den-f
 TGGAGATGGCA**CCACTACCGCAACTGTGCTG**GCCCAGTCTTTGGTGCATGAAGGCCTGAA 60
 GAACGTCACCGCCGGCTCCAACCCGATCGCCCTGCGTTCGGTATCGAGAAGGCTTCCGA 120
 GGCCATCGTCAAGGAGCTCGTTCGAGCTGCCAAGGACGTCGAGACCAAGGATCAGATCGC 180
 TGCCACCGCAACGATCTCCGCCCGGGATCCGGAAGTCGGCGAGAAGATCGCCGAAGCGCT 240
 GGACAAGGTCGGCCAGGATGGCGTTCGTGACCGTCGAGGACAACAACCGCTTCGGCCTGGA 300
 TCTTGACTTACCAGGACATACGTTTCGACAAGGGCTACATCGCCCCGTA CTTCGTGAC 360
 B_den-r **B_den-std-r**
 CAACGCCGAGGACCAGACCGGGTGCTCGAA**GACCCGTACATCCTCCTGAC**CTCCGGCAA 420
 GCTGAGCTCCCAGCAGGATGTCGTGCATGTGGCCGAGCTGGTCATGAAGACCGGCAAGCC 480
 GCTGATGATCATCGCCGAGGACGTTGACGGCGAGGCTCTGCCGACCCTGATCCTGAACAC 540
 CATCCGTGGCACGTTCAAGTCTGCGCCGTGAAAGCTCCTGGTTTCGGGG 590

***B. gallicum* JCM 8224^T** (GenBank Akzessionsnr.: AF240575)

TGGTGACGGGACTACAACCTGCGACCGTGCTCGCTCAGGCTCTCGTGACGAAGGTCTGA 60
B_gal-std-f
 AGAACGTGGTGCCTGGTTCCAACCCGATCGCATTGCGCCGTGGCAT**TGAGAAGGCTTCCG** 120
B_gal-f
ACGCCATCGTCAAGCAGCTCGTCAAGTCCGCCAAGCCTGTGGAAACCAAGGAGCAGATCG 180
 CTGCCACCGCAACGATTTTCGGCTGCTGACCCCGAGGTTGGCGAGAAGATTGCCGAAGCGC 240
 TCGACAAGGTCGGCCAGGATGGCGTCGTGACCGTGGAAGACAACAATCGTTTCGGCCTGG 300
B_gal-r **B_gal-std-r**
 ACCTCGAGTTCACCGAAGGTATGCGCTTCGCA**CAAGGGCTACATCTCCC**CGTACTTCGTGA 360
 CCAACGCTGAGGATCAGACGGCTGTGCTCGACGATCCGTACATCCTGATGACCTCGAGCA 420
 AGGTCTCGTCGACGACGACGTTGGTGACATCGCCGAGCTCGTCATGAAGACGGGCAAGC 480
 CGCTGCTGATCATCGCCGAGGATGTGGATGGCGAGGCTCTGCCGACGTTGATCCTGAACA 540
 ACATCCGTGGCACGTTCAAGTCCTGCGCCGTCAAAGCACCTGGGTTTGGCGA 592

***B. longum* ssp. *longum* ATCC 15707^T** (GenBank Akzessionsnr.: AY835622)

GCAACCGTGCTTGCTCAGTCCCTGGTTACAGAGGTCTGAAGAAGCTGGTGCCTGGCTCC 60
 AACCCGATCGCCCTGCGTCGCGGCATCGAGAAGGCCACCGAGGTCATCGTCAAGGAACTC 120
 GTCGCTGCCGCCAAGGACGTCGAGACCAAGGACCAGATCGTGCTACCGCCACCATCTCC 180
B_long-std-f
 GCCGCTGACCCTGAGGTGCGCGAGAAGATCG**CTGAGGCTCTGGACAAGGTCG**GCCAGGAC 240
B_lon-f
 GGCGTTGTGACCGTTGAAGACAACAACCGCTTCGGCCTGGACCTCGACTTCACCGAGGGC 300
 ATGCCGTTTGAACAAGGGCTACATCGCCCCGACTTTCGTACCAACGCTGACGACCAGACC 360
 GCAGTGCTCGAAGATCCGTACATTTCTGCTGACCTCCGGCAAGGTCTCATCCCAGCAGGAC 420
 ATCGTGACGTTGCCGAGCTGGTCATGAAGACC GGCAAGCCGCTGCTGATCATCGCTGAG 480
B_lon-r **B_long-std-r**
 GACGTCGACGGCGAAGCACTGCCGACCTTGAT**CCTGAACAACATCCGTGGCACCTT**CAAG 540
 TCCTGCGCCGTC 552

***B. pseudocatenuatum* DSM 204387^T** (GenBank Akzessionsnr.: AY004274)

GGAGATGGCACCACTACGGCGACCGTGCTCGCCAGTCCCTGGTGCACGAAGGCCTGAAG 60
B_pcat-std-f
 AACGTCACCGCCGGCTCCAACCCGATCGCTTTG**CGTCTGGTATCGAGAAGGCTTCCGAA** 120
B_pcat-f
 GCCATCGTCAAGGAGCTTATCGCAGCTGCCAAGGACGTTGAGACCAAGGATCAGATCGCC 180
 GCTACCGCAACGATTTCCGCCGCGGATCCGGAAGTCGCGGAGAAGATCGCCGAAGCTCTT 240
 GACAAGGTTGGCCAGGACGGCGTCGTGACCGTTGAGGACAACAACCGCTTCGGCCTGGAT 300
 CTGGACTTCACCGAAGGCATGCGTTTCGACAAGGGCTATATCGCTCCGTACTTCGTGACC 360
 AACGCCGAAGATCAGACCGCAGTGCTCGAAGAGCCGTACATCCTGCTGACCTCCGGCAAG 420
B_pcat-r
 GTGAGCTCTCAGCAGGACGTCGTGCACATCGCCGAGCTGGTCATGAAGACCGGCAAGCCG 480
B_pcat-std-r
 CTGCTGATCATCGCTGAAGACGTTG**ATGGCGAGGCTCTGCCGACCTT**GATTCTGAACAAC 540
 ATCCGCGGCACCTTCAAGTCCTGCGCAGTTAAAGCCCTGGTTTCGGCA 589

***B. pseudolongum* ssp. *pseudolongum* JCM 1205^T**
(GenBank Akzessionsnr.: AF240573)

TGGGGATGGCACAACACTACGGCGACCGTGCTGGCCCAGTCCCTCGTGACGAAGGCCTCAA 60
B_plong-std-f
GAACGTTGTGGCCGGTTTCGAACCCGATCGCGCTGCGCCGTGGCATCGAGAAGGCCTCTGA 120
 B_plon-f
 CGCAATCGTCAAGGAACTTGTGGCCTCCGCCAAGCCGGTGGAAAACCAAGGAGCAGATCGC 180
 AGCCACCGCGACGATCTCCGCCCGGATCCCGAGGTGCGCGAGAAGATCGCCGAGGCGCT 240
 CGACAAGGTTGGCCAGGATGGCGTGGTGACCGTTCGAAGACAACAACCGCTTCGGCCTCGA 300
 CCTTGAGTTACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGGTACATCTCCCCGTA^TCTCGTAAC 360
 B_plon-r
 CAACGTCGACGACCAGACCGCCGTGCTCGACGACCCGTACATCCTGCTCACAAGCGGCAA 420
B_plong-std-r
 GGTATCGTTCGACGAGGACGTGGTCCACATCGCCGAACTCGTGATGAAGACCGGCAAGCC 480
 GCTGCTGATCATCGCCGAGGACGTGGACGGCGAAGCACTGCCGACGCTGATCCTCAACAA 540
 CATCCGTGGCACGTTCAAGTCTCGCGGTTAAAGCGCCCGGCTTTGGAGA 591

***B. thermophilum* JCM 1207^T** (GenBank Akzessionsnr.: AF240567)

B_the-std-f
 TGGAGATGGGACCACGACGGCAACGGTGCTCGCCCAGTCCCTGGTCCATGAAGGCCTGAA 60
GAACGTGGTCCGGGCTCCAACCCGATTGCCCTGCGTTCGCGGCATCGAGAAGGCCGCCGA 120
 B_the-f
 CGAAATCGTCAAGGAACTGGTTCGCTTCCGCCAAGGATGTGGAGACCAAGGACCAGATCGC 180
 AGCCACCGCAACGATTTCCGCTGCTGACCCGTGAGGTGCGCGAGAAGATCGCTGAAGCGCT 240
 CGACAAGGTCGGCCAGGATGGTGTGCTGACCGTTCGAGGACAACAACCGCTTCGGTCTGGA 300
 TCTCGAGTTCACTGAGGGCATGCGTTTCGACAAGGGGTACATCGCCCCGTA^TCTCGTAC 360
 CAACGCTGACGATCAGACCGCAGTGCTGGAGAACCCGTACATCCTGCTCACCTCGGGCAA 420
 B_the-r
 GGTGTCCAGCCAGCAGGACATCGTTCACCTGGCTGACTTGGTTCATGAAGAGCGGCCGTCC 480
B_the-std-r
GCTGCTGATCGTGGCTGAGGATGTCGACGGTGAAGCGCTGCCGACCCTGATTCTCAACAA 540
 GATCCGCGGCACCTTCAACACCTGCGCAGTTAAGGCGCCCGGATTTGGTGA 591

Abbildung A2. Lage der Oligonukleotid-Primerbindestellen im *groEL*-Gen der Referenzstämme für die Herstellung der Quantifizierungsstandards zur spezifischen Quantifizierung von Bifidobakterienspezies (fett gedruckt). Die Bindestellen der artspezifischen Oligonukleotid-Primer sind unterstrichen.

Die während dieser Arbeit verwendeten Medien, Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser hergestellt. Die Chemikalien wurden von den Firmen Calbiochem, Serva, Roth, Fluka, Oxoid, Difco und Merck bezogen und waren analytisch rein. Alle verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle A1. Zusammensetzung Nestlé NAN 1 Protect Start (je 100 g)

Makronährstoffe	
Kohlenhydrate (Laktose, Oligosaccharide)	61,5 g
Fette (Milchfett, Nicht-Milchfett, Lecithine mit Cholin, Inositol, Linolensäure, α -Linolensäure, Arachidonsäure und Docosahexaensäure)	27,9 g
Proteine (Molkenprotein/Kasein Verhältnis: 70/30)	9,2 g
Mikronährstoffe	
Kalium	550 mg
Kalzium	400 mg
Chlorid	330 mg
Natrium	240 mg
Phosphor	220 mg
Magnesium	57 mg
Zink	3,3 mg
Kupfer	0,26 mg
Jod	75 μ g
Mangan	30 μ g
Selen	10 μ g
Eisen	6,6 mg
Taurin	46 mg
Carnitin	18 mg
Vitamin A	1 733 IE
Vitamin B1 (Thiamin)	0,48 mg
Vitamin B2 (Riboflavin)	1,6 mg
Vitamin B6 (Pyridoxin)	0,68 mg

Tabelle A1. (Fortsetzung)

Vitamin B12 (Cobalamin)	2,4 µg
Vitamin C	70 mg
Vitamin D	320 IE
Vitamin E	10,4 IE
Vitamin K	66 µg
Biotin	18 µg
Folsäure	60 µg
Nikotinsäure	7 mg
Pantothensäure	4 mg

Standard-Dosierung 13,6 g/100 ml
Energiegehalt 2064 kJ/100 g (493 kcal/100 g)

Tabelle A2. Zusammensetzung Ringerlösung (1/4 konzentriert)

Bestandteil	in 1 L H₂O
2 Ringer Tabletten (Oxoid Ltd, Cambridge, UK)	
Natriumchlorid	4,5 g
Kaliumchlorid	0,22 g
Calciumchlorid Hexahydrat	0,24 g
Natriumdicarbonat	0,1 g
L-Cystein	0,5 g

Der Puffer wurde mit N₂/CO₂ (80/20, vol/vol) begast. Autoklaviert für 15 min bei 121°C.

Tabelle A3. Zusammensetzung Extraktionspuffer

Bestandteil	Konzentration in 1 x PBS
EDTA pH 7,6	30 mM
Sojabohnen Trypsin Inhibitor	105 µg/ml

Autoklavieren für 15 min bei 121°C. Trypsin Inhibitor wurde in 67 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,6) gelöst, sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) in Aliquots bei -20°C gelagert und frisch zugesetzt; pH 8,1

Tabelle A4 Zusammensetzung ST-Medium

Bestandteil	in 1 L H₂O
Tryptisch verdautes Pepton aus Fleisch	9 g
D(+)-Glukose	6 g
Hefeextrakt	4 g
Fleischextrakt	3 g
Natriumchlorid	3 g
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	2 g
Proteose Pepton	1 g
Tween [®] 80	0,5 ml
L-Cystin-HCl	0,25 g
L-Cystein	0,25 g
Magnesiumsulfat Heptahydrat	0,1 g
Eisensulfat Heptahydrat	5 mg
Mangansulfat Dihydrat	3,4 mg

Das Medium wurde mit N₂/CO₂ (80/20, vol/vol) begast; autoklaviert für 15 min bei 121°C; pH 7,0

Tabelle A5. Zusammensetzung 496 YCFA GSC-Medium (NCIMB Ltd, Aberdeen, Schottland)

Bestandteil	in 1 L H₂O
Pankreatisch verdautes Casiton	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
Natriumhydrogencarbonat	4 g
D(+)-Glucose	2 g
Maltose	2 g
Cellobiose	2 g
Minerallösung I	150 ml
Minerallösung II	150 ml
Fettsäure-Mix	3,1 ml
Häminlösung	10 ml
Vitaminlösung I	1 ml
Vitaminlösung II	1 ml
Resazurin	1 mg
L-Cystein	1 g
Minerallösung I	in 1 L H₂O
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	3 g
Minerallösung II	in 1 L H₂O
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	3 g
<i>di</i> -Ammoniumsulfat	6 g
Natriumchlorid	6 g
Magnesiumsulfat	0,6 g
Kalziumchlorid	0,6 g
Fettsäure-Mix	
Essigsäure	17 ml
Propionsäure	6 ml
<i>n</i> -Valeriansäure	1 ml
Isovaleriansäure	1 ml
Isobuttersäure	1 ml
Lagerung bei 4°C.	

Tabelle A5. (Fortsetzung)**Häminlösung (0,5 mg/ml)****in 100 ml H₂O**

Hämin

50 mg

Hämin in 1 ml 1 N NaOH lösen und auf 100 ml auffüllen. Lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C.

Vitaminlösung I**in 100 ml H₂O**

Biotin

1 mg

Cobalamin

1 mg

p-Aminobenzoesäure

3 mg

Folsäure

5 mg

Pyridoxamin

15 mg

Sterilfiltration (Porengröße 0,22 µm) und Lagerung bei 4°C.

Vitaminlösung II**in 100 ml H₂O**

Thiamin

5 mg

Riboflavin

5 mg

Sterilfiltration (Porengröße 0,22 µm) und Lagerung bei 4°C.

Alle Komponenten des Mediums (außer Vitaminlösung II und L-Cystein) wurden aufgeköcht und unter Begasung mit N₂/CO₂ (80/20, vol/vol) abgekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von L-Cystein und die Einstellung des pH-Wertes von 7,3 mit Natriumhydroxid. Nachdem das Medium autoklaviert wurde, erfolgte die Zugabe der Vitaminlösung II.

Tabelle A6. Zusammensetzung Tris-Acetat-EDTA-Puffer (50x TAE-Puffer)**Bestandteil****in 1 L H₂O**

Tris

242 g

Essigsäure

57,1 g

EDTA

18,6 g

Mittels Natriumhydroxid pH-Wert von 8,3 eingestellt.

Tabelle A7. Zusammensetzung Phosphat-gepufferte Salzlösung (10x PBS)

Bestandteil	in 1 L H₂O
Natriumchlorid	80 g
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	14,4 g
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	2,4 g
Kaliumchlorid	2 g
pH 7,2 mit Natriumhydroxid; autoklaviert für 15 min bei 121°C	

Tabelle A8. Zusammensetzung Tomatensaft-Agar-Platten

Bestandteil	in 1 L H₂O
Tomatensaft	400 ml
Eugon Agar	45,4 g
Bacto Agar	5 g
Maltose	10 g
Hämin-Lösung (0,5 mg/ml)	10 ml
Autoklaviert für 15 min bei 121°C. Nach Abkühlung auf 40-50°C in Petrischalen gegossen.	

Tabelle A9. Zusammensetzung 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung

Bestandteil	in 1 L H₂O
Natriumchlorid	9 g
Autoklaviert für 15 min bei 121°C.	

Tabelle A10. Fäkale Zellkonzentrationen der Gesamtbakterien und ausgewählten Taxa in den Studiengruppen^a

Bakterien	REF-Gruppe			KON-Gruppe			SYN-Gruppe		
	< 2 W	6 W	3 M	< 2 W	6 W	3 M	< 2 W	6 W	3 M
Gesamtbakterien	11,0 ± 0,1 (10,2-11,8)	11,1 ± 0,1 (10,5-11,9)	11,2 ± 0,1 (10,5-11,9)	11,1 ± 0,1 (10,3-11,6)	10,8 ± 0,1 (9,0-11,5)	11,0 ± 0,1 (10,3-11,7)	11,0 ± 0,1 (9,2-11,5)	11,3 ± 0,1 (10,2-11,7)	11,4 ± 0,1 (10,8-12,0)
Bacteroidetes	7,8 ± 0,5 (6,0-10,4)	7,8 ± 0,5 (5,7-10,7)	8,1 ± 0,5 (5,9-10,8)	7,2 ± 0,3 (5,5-9,9)	8,1 ± 0,4 (6,1-10,6)	8,7 ± 0,3 (6,1-9,8)	6,9 ± 0,3 (5,8-9,0)	7,6 ± 0,4 (6,0-10,3)	7,8 ± 0,3 (6,1-9,9)
<i>Bifidobacterium</i>	9,4 ± 0,7 (6,4-12,0)	10,9 ± 0,3 (7,0-12,1)	11,0 ± 0,2 (9,3-12,0)	8,5 ± 0,7 (5,5-11,2)	10,2 ± 0,4 (6,9-11,4)	10,5 ± 0,3 (7,3-11,6)	8,1 ± 0,6 (6,0-11,5)	11,4 ± 0,1 (10,5-11,9)	11,6 ± 0,1 (10,8-12,0)
<i>C. leptum</i> -Gruppe	6,2 ± 0,5 (5,7-7,1)	6,3 ± 0,3 (5,3-7,6)	7,1 ± 0,4 (5,8-9,5)	5,9 ± 0,3 (4,6-7,8)	6,5 ± 0,4 (4,8-9,0)	7,1 ± 0,3 (5,5-9,1)	5,9 ± 0,3 (5,3-7,0)	6,6 ± 0,2 (5,6-8,2)	6,9 ± 0,2 (4,8-9,0)
Enterobacteriaceae	10,7 ± 0,1 (9,6-11,1)	9,4 ± 0,3 (7,1-10,6)	9,9 ± 0,2 (8,3-10,8)	10,3 ± 0,3 (7,0-11,6)	10,3 ± 0,2 (8,6-11,3)	10,0 ± 0,1 (9,1-10,8)	10,3 ± 0,4 (6,9-11,3)	10,2 ± 0,1 (8,6-10,9)	10,1 ± 0,2 (7,7-11,1)
<i>Lactobacillus</i>	8,3 ± 0,6 (6,0-11,2)	9,6 ± 0,3 (6,7-11,2)	9,7 ± 0,3 (7,8-11,7)	7,8 ± 0,4 (6,6-10,8)	8,2 ± 0,3 (6,3-10,9)	8,0 ± 0,3 (6,2-10,0)	7,4 ± 0,4 (5,8-10,8)	9,0 ± 0,3 (6,6-11,7)	8,9 ± 0,4 (6,8-10,9)
<i>Staphylococcus</i>	7,9 ± 0,4 (5,4-8,8)	7,9 ± 0,2 (5,7-9,2)	7,4 ± 0,2 (5,9-8,8)	7,2 ± 0,4 (5,8-8,7)	7,6 ± 0,2 (6,3-8,6)	7,7 ± 0,1 (6,7-8,5)	7,0 ± 0,3 (5,5-8,8)	7,8 ± 0,2 (5,9-9,0)	7,4 ± 0,2 (5,8-8,0)
<i>C. difficile</i>	-	7,0	8,4	-	7,7	8,5 ± 0,4 (7,8-9,2)	-	9,8	9,4 ± 0,3 (9,1-9,7)
<i>S. epidermidis</i>	9,1 ± 0,4 (6,5-10,1)	8,0 ± 0,2 (6,6-9,7)	7,6 ± 0,2 (6,4-8,3)	7,3 ± 0,4 (5,6-9,7)	6,4 ± 0,2 (5,8-7,4)	6,3 ± 0,1 (6,1-6,7)	7,4 ± 0,3 (6,0-9,0)	6,4 ± 0,1 (5,9-7,0)	6,5 ± 0,1 (5,8-7,4)

^a Werte in log₁₀ Zellen/g Fäzes TM (MW ± SEM); Wertebereich in Klammern; < 2 W, 2 Wochen; 6 W, 6 Wochen; 3 M, 3 Monate

Tabelle A11. Fäkale Zellkonzentrationen der Bifidobakterienspezies in den Studiengruppen^a

Bakterien	REF-Gruppe			KON-Gruppe			SYN-Gruppe		
	< 2 W	6 W	3 M	< 2 W	6 W	3 M	< 2 W	6 W	3 M
<i>B. adolescentis</i>	7,9 ± 1,0 (6,9-9,0)	7,0	-	7,2	9,6	7,7 ± 1,5 (6,2-9,1)	9,6 ± 0,4 (9,2-10,0)	8,7 ± 0,9 (6,3-10,4)	9,0 ± 0,5 (7,8-9,9)
<i>B. animalis</i>	-	7,9	-	-	-	8,9 ± 0,0 (8,9-8,9)	7,1	9,3 ± 0,1 (8,4-10,0)	9,4 ± 0,1 (8,7-10,3)
<i>B. bifidum</i>	10,3 ± 0,7 (8,3-11,3)	10,1 ± 0,3 (9,1-11,5)	10,3 ± 0,2 (9,3-10,9)	8,4 ± 1,1 (7,3-9,6)	8,5 ± 0,6 (6,2-9,9)	9,8 ± 0,2 (9,1-10,5)	10,6 ± 0,1 (10,5-10,7)	9,8 ± 0,2 (8,9-10,5)	9,8 ± 0,4 (6,5-10,9)
<i>B. breve</i>	5,7	8,7 ± 0,7 (5,6-10,5)	10,2 ± 0,3 (7,8-11,2)	6,4 ± 0,5 (5,6-8,4)	8,5 ± 0,7 (5,6-10,4)	9,0 ± 0,5 (5,6-11,0)	6,1 ± 0,1 (5,7-6,3)	9,1 ± 0,6 (5,6-11,0)	9,4 ± 0,6 (5,6-11,1)
<i>B. catenulatum</i>	-	6,7	7,7	9,3	8,8 ± 0,0 (8,7-8,8)	8,9 ± 0,2 (8,3-9,3)	-	8,8	9,3 ± 0,2 (8,8-9,9)
<i>B. dentium</i>	-	9,1	9,5 ± 0,2 (9,3-9,6)	-	8,3 ± 0,3 (7,7-9,1)	8,8 ± 0,3 (8,2-9,2)	7,8	9,0 ± 0,5 (6,7-10,8)	8,6 ± 0,2 (7,6-9,9)
<i>B. longum</i>	8,1 ± 0,6 (6,2-10,1)	9,2 ± 0,4 (6,0-10,8)	9,7 ± 0,1 (8,5-10,3)	8,5 ± 0,8 (5,4-10,5)	9,1 ± 0,4 (6,4-10,8)	8,7 ± 0,5 (5,9-10,2)	9,3 ± 0,1 (9,3-9,4)	10,4 ± 0,1 (9,7-11,0)	10,4 ± 0,1 (9,2-11,0)
<i>B. pseudocatenulatum</i>	9,2 ± 0,7 (8,3-10,5)	10,0 ± 0,2 (9,2-10,5)	9,8 ± 0,4 (7,9-10,7)	6,6 ± 0,7 (5,9-7,4)	8,7 ± 1,2 (7,4-9,9)	6,1	8,6 ± 1,4 (7,2-9,9)	9,2 ± 1,3 (6,6-10,6)	9,1 ± 0,7 (6,6-10,7)

^a Werte in log₁₀ Zellen/g Fäzes TM (MW ± SEM); Wertebereich in Klammern; *B. angulatum*, *B. gallicum*, *B. pseudolongum* und *B. thermophilum* wurden in keiner Stuhlprobe detektiert; < 2 W, 2 Wochen; 6 W, 6 Wochen; 3 M, 3 Monate

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. M. Blaut für die Übertragung des interessanten Projekts mit der Möglichkeit einer Methodenentwicklung und der selbständigen Bearbeitung. Außerdem danke ich ihm für die zu jeder Zeit gewährte Bereitschaft meine Arbeit zu unterstützen und seine konstruktiven Kritiken.

Bei unseren Kooperationspartnern Corina Boschat, Phd, Enea Rezzonico, Phd, Bernard Berger, Phd, Florence Rochat, Phd, Sophie Pequet, Phd und Aude Tavenard, MBIostat, von Nestec Ltd, Nestlé Nutrition (Vevey, Schweiz) möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die gute Organisation der Studie, die produktiven Treffen bedanken.

Dem Labor des Hôpital Saint Joseph (Marseille/Frankreich) danke ich für die sorgfältige Aufbewahrung und die verlässliche Verschickung der Proben.

Marion Urbich möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung der ELISA danken.

Weiterhin danke ich Julia, Steffen, Anni und Kathleen für die nützlichen wissenschaftlichen Diskussionen, ihre Unterstützung auch in schwierigen Zeiten und die entspannenden Mittagspausen.

Meinen Korrekturlesern Anni, Kathleen und Tom danke ich besonders für ihre kritischen Anmerkungen.

Bei den MitarbeiterInnen der Gastrointestinalen Mikrobiologie bedanke ich mich für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit (auch im Rahmen des DIfE-Sommerfests 2011).

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für Ihr Vertrauen und Ihre Unterstützung. Vor allem Tom möchte ich für sein wissenschaftliches Verständnis und noch mehr für seine große Geduld und alltägliche Unterstützung in vielerlei Hinsicht danken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit ist bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht worden.

Potsdam, im September 2013

Jana Junick